



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INFLUÊNCIA DA POLARIZAÇÃO ELÉCTRICA NO CRESCIMENTO DE HIDROXIAPATITE PARA IMPLANTES ÓSSEOS

Ana Sofia da Mota Pedrosa

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção
de Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Professora Doutora Maria do Carmo Lança

Co-Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges

LISBOA

Junho de 2011

**INFLUÊNCIA DA POLARIZAÇÃO ELÉCTRICA NO CRESCIMENTO DE
HIDROXIAPATITE PARA IMPLANTES ÓSSEOS**

Ana Sofia da Mota Pedrosa

Não fracassei vez nenhuma...
Apenas fiz 10.000 tentativas que não deram certo.

Thomas Edison

AGRADECIMENTOS

O trabalho de investigação científica é caracterizado por uma enorme dificuldade que é, simultaneamente, o seu grande privilégio. O investigador, sozinho, por mais douto e hábil que seja, pouco consegue fazer. O contributo isolado deste é inócuo para o avanço científico e, principalmente, para o avanço civilizacional que lhe deve ser inerente. O apoio de uma equipa, mais ou menos completa e complexa, são essenciais para que este possa progredir no entanto, o trabalho em equipa nem sempre é fácil e obriga a uma compatibilização não só das competências técnicas, mas também pessoais.

Neste âmbito, tive o privilégio de ser integrada na equipa composta pela Professora Doutora Maria do Carmo Lança e pelo Professor Doutor João Paulo Borges, que me permitiu apresentar a presente dissertação. A vossa incansável dedicação e empenho merece o meu maior e honroso agradecimento. A vocês...o meu MUITO MUITO OBRIGADA!

Agradeço também ao meu fiel companheiro de laboratório, Professor Eugen Neagu, pela companhia e paciência, boa disposição e conhecimentos transmitidos. A sua ajuda e preocupação revelaram-se fulcrais para a concretização deste projecto.

Um agradecimento muito especial dirijo também a todo o grupo de polímeros, em particular à Mestre Ana Baptista.

As minhas palavras de agradecimento vão ainda para a Esther Merino e para a Patrícia Franco, assim como para todos os professores que, directamente, contribuíram para o trabalho aqui apresentado: Professor Doutor Carlos Dias, Professora Doutora Madalena Dionísio, Professora Doutora Margarida Rolim, Professora Doutora Regina Duarte, Professor Doutor Hugo Águas, Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, Professor Doutor João Pedro Veiga, Professor Doutor Rui Silva e Professor Doutor Brás Fernandes.

Porém, este projecto nunca poderia ser desenvolvido sem outras aptidões, de carácter pessoal, tais como a perseverança, espírito de sacrifício, devoção e abnegação, que me foram transmitidas pelos meus pais, Lídia e Boaventura, e irmão, João, que, sempre e incansavelmente, me apoiaram e aconselharam. A eles devo tudo o que sou e muito, senão quase tudo, daquilo que alcancei nos mais variados aspectos, entre os quais os académico-científicos. Ao meu maninho um GRANDE obrigada

pelo apoio e protecção na minha fase crítica de bloqueio mental... as palavras são demasiado vãs para demonstrar tal agradecimento!

Também outros, para além dos meus pais e irmão, apresentaram o seu contributo de incentivo e apoio, principalmente nos pontuais momentos difíceis deste percurso académico. Destaco, entre estes, as meninas do 48 (Tatiana e Dina), os meus “biocolegas” (CJ, Miranda, Aninhas, Coelho, Xico e Cláudio), o Gui, o Nuninho e a “grupeta fantástica” que me acompanhou nos seis mais marcantes meses do meu percurso académico. É impossível descrever o que significaram, e significam, para mim restando-me apenas agradecer-vos pela “inglória tarefa” de serem meus amigos e de partilharem não só os meus sucessos, mas também as minhas dificuldades.

As últimas, mas não menos calorosas, palavras de carinho dedico às minhas grandes amigas Joana Neto, Mariana Lança e Daniela Flórido...é com enorme alegria que recordo a amizade que construímos!

RESUMO

O interesse pela aplicação de biomateriais para substituição e regeneração de tecidos duros tem vindo a aumentar significativamente na última década. A hidroxiapatite sintética [HAp; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] é considerada um dos biomateriais mais promissores, devido à sua biocompatibilidade, bioactividade e osteocondutividade. Porém, a HAp sintética possui uma fraca capacidade osteogénica, quando comparada com a apresentada pelo tecido ósseo, o que conduz a um lento processo de mineralização deste tecido.

O presente trabalho incidiu no estudo da influência da polarização eléctrica na bioactividade da hidroxiapatite.

Inicialmente sintetizaram-se nanopós de hidroxiapatite pelo método sol-gel, os quais foram prensados, a frio, formando pastilhas. Posteriormente, caracterizaram-se os pós e pastilhas de HAp em termos morfológicos e estruturais e quanto às propriedades eléctricas e dieléctricas. Finalmente, realizaram-se testes de bioactividade numa solução salina, *PBS*, simuladora de fluído corporal, a 37°C, utilizando-se, para tal, amostras de controlo (não polarizadas) e pastilhas polarizadas a 200°C, durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico DC de 20kV/cm de intensidade.

Decorridos os testes de bioactividade caracterizaram-se as amostras, por SEM e ICP-AES, de modo a inferir acerca da precipitação de cristais apatíticos na superfície das amostras.

Palavras chave: hidroxiapatite; polarização eléctrica; propriedades eléctricas; propriedades dieléctricas; ensaios de bioactividade.

ABSTRACT

Over the last decade, interest in the application of biomaterials for replacement and regeneration of hard tissues has increased significantly. Synthetic hydroxyapatite [HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] is considered one of the most promising biomaterials due to its biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity. However, the synthetic HAp has a weak osteogenic capacity compared to that presented by the bone tissue, leading to a slow process of mineralization of this tissue.

This study focused on the influence of polarization on the bioactivity of hydroxyapatite.

Initially, hydroxyapatite nanopowders were synthesized by sol-gel method, which were cold pressed to obtain disc-shaped samples. Subsequently, these powders and discs of HAp were characterized by their structure and morphology, and by their electrical and dielectric properties. Finally, bioactivity tests in a simulated body fluid solution, *PBS*, at 37°C, were performed, using for this end control samples (non-polarized) and samples which had been polarized at 200°C under a DC electric field with 20kV/cm of intensity.

After the bioactivity tests the samples were characterized by SEM and ICP-AES technique, to analyze the bonelike apatite formation on polarized and non-polarized hydroxyapatite samples.

Keywords: hydroxyapatite; electrical polarization; electrical properties; dielectric properties; bioactivity tests.

LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

AC: *Alternating Current* – Corrente Alternada

CaP: Fosfato de Cálcio

DC: *Direct Current* – Corrente Contínua

DRS: *Dielectric Relaxation Spectroscopy*

DRX: *X-ray Diffraction*

EDS: *Energy Dispersive X-Ray*

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HAp: Hidroxiapatite

ICC: *Isothermal Charging Current*

ICP-AES: *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy*

IDC: *Isothermal Discharging Current*

PBS: *Phosphate Buffer Solution*

SEM: *Scanning Electron Microscope*

TCP: Fosfato Tricálcio (α , β)

TEM: *Transmission Electron Microscope*

TSDC: *Thermally Stimulated Discharge Current*

\vec{E} : Campo eléctrico

\vec{H} : Campo magnético

\vec{j} : Densidade de corrente

\vec{D} : Deslocamento dieléctrico

\vec{B} : Indução magnética

\vec{p} : Momento dipolar

\vec{P} : Polarização

χ^* : Susceptibilidade dieléctrica do material

E_p : Campo eléctrico de polarização

f : Frequência [Hz]

t_0 : Tempo de espera desde a remoção do campo eléctrico e o início da medição das correntes termoestimuladas

T_p : Temperatura de polarização

t_p : Tempo de polarização

ϵ' : Componente real da permitividade

ϵ'' : Componente imaginária da permitividade

ϵ_0 : Permitividade dieléctrica no vácuo ($8.854 \times 10^{-12} \text{F/m}$)

σ' : Componente real da condutividade

σ'' : Componente imaginária da condutividade

Ω : Frequência

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS	V
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ENQUADRAMENTO, OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	XV
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	2
I.1 Osso	2
I.2 Biomaterial	3
I.3 Hidroxiapatite	3
I.3.1 Comportamento biológico da HAp	6
I.3.1.1 Reabsorção/Biodegradação da HAp	7
I.3.1.2 Importância da porosidade nos cerâmicos de HAp para aplicações biomédicas	8
I.4 Propriedades Eléctricas e Dieléctricas: Fundamentos.....	8
I.4.1 Piezoelectricidade	10
I.4.1.1 Comportamento eléctrico da HAp.....	11
I.4.1.2 Mecanismo de condução na HAp	12

I.4.2 Precipitação de cristais apatíticos na superfície da HAp imersa em soluções simuladoras do fluido biológico.....	13
I.4.2.1 Importância das proteínas no crescimento de apatites na superfície de cerâmicos de HAp	14
I.5 Processo Sol-Gel.....	15
I.5.1 Etapas do processo sol-gel.....	16
I.5.1.1 Formação da solução inicial/sol.....	16
I.5.1.2 Formação do gel	16
I.5.1.3 Envelhecimento	16
I.5.1.4 Secagem.....	17
I.5.1.5 Sinterização.....	17
I.5.2 Vantagens e Desvantagens do método Sol-Gel	18
 CAPÍTULO II – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	 21
II.1 Análise Morfológica e Estrutural	21
II.1.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	21
II.1.2 Microscopia Electrónica de Transmissão(TEM)	22
II.1.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	22
II.1.4 Difracção de Raios-X (DRX).....	23
II.2 Caracterização eléctrica e dieléctrica	24
II.2.1 Correntes de Carga Isotérmicas/ Correntes de Descarga Isotérmicas (ICC/IDC)	24
II.2.2 Corrente de Descarga Termicamente Estimulada (TSDC)	25
II.2.2.1 Descrição da técnica TSDC	26
II.2.3 Espectroscopia de Relaxação Dieléctrica (DRS)	27
II.3 Ensaios de Bioactividade.....	29
II.3.1 Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Induzido (ICP-AES)	29
 CAPÍTULO III – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	 31
III. 1 Esquema Resumo do Procedimento Experimental	31
III.2 Preparação das amostras de HAp.....	32
III.2.1 Método Sol-Gel: obtenção dos nanopós de HAp.....	32
III.2.1.1 Reagentes	32
III.2.1.2 Técnica Experimental.....	32
III.2.2 Produção das pastilhas de HAp.....	33

III.3 Caracterização das Amostras de HAp	33
III.3.1 Caracterização Morfológica e Estrutural.....	33
III.3.1.1 SEM.....	33
III.3.1.2 TEM.....	33
III.3.1.3 FTIR	34
III.3.1.4 DRX	34
III.3.2 Caracterização Eléctrica	34
III.3.2.1 ICC/IDC.....	34
III.3.2.2 TSDC.....	35
III.3.2.3 DRS.....	36
III.3.3 Ensaio de Bioactividade	36
III.3.3.1 Produção da solução PBS (<i>Phosphate Buffer Solution</i>).....	37
III.3.3.2 ICP-AES.....	37
 CAPÍTULO IV – RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	 39
IV.1 Caracterização Morfológica e Estrutural	39
IV.1.1 SEM	39
IV.1.2 TEM	40
IV.1.3 FTIR	41
IV.1.4 DRX.....	42
 IV.2 Caracterização Eléctrica e Dieléctrica	 44
IV.2.1 ICC/IDC.....	44
IV.2.2 TSDC.....	50
IV.2.3 DRS.....	62
 IV.3 Ensaio de Bioactividade.....	 66
 CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	 72
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: a) Estrutura da hidroxiapatite – célula unitária; b) Estrutura da hidroxiapatite ao longo do eixo c [Monte, 2003].	4
Figura I.2: Fórmula química da hidroxiapatite estequiométrica e possíveis substituições iónicas dos grupos hidróxilo (OH^-), fosfato (PO_4^{3-}) e cálcio (Ca^{2+}) [adaptado de Matsumoto, 2007].	4
Figura I.3: Tensão gerada quando um material piezoeléctrico é sujeito a forças compressivas [Callister, 2011].	11
Figura I.4: Polarização da HAp pela aplicação de um campo eléctrico [Nakamura, 2009].	12
Figura I.5: Método sol-gel [adaptado de CENTEXBEL].	15
Figura II.1: Esquema representativo do procedimento efectuado para a obtenção de um espectro pelo método ICC/IDC [adaptado de Neagu, 2004].	24
Figura II.2: Esquema representativo do procedimento efectuado para a aquisição de um espectro por TSDC [adaptado de Gun'ko, 2007].	27
Figura II.3: Processos dinâmicos passíveis de ser observados por DRS num espectro de ϵ' em função de f [adaptado de Dias, 2009].	28
Figura IV.1: Imagem de SEM dos pós de HAp produzidos pelo método sol-gel e sinterizados a 600°C.	39
Figura IV.2: Imagem de SEM de uma pastilha de HAp produzida pela prensagem, a 200bar, de 0.100g de pó de HAp produzido pelo método sol-gel e sinterizado a 600°C.	40
Figura IV.3: Espectro de EDS obtido para uma pastilha de HAp na zona assinalada na Figura IV.2	40
Figura IV.4: Imagem de TEM dos pós de HAp obtidos pelo método sol-gel.	41
Figura IV.5: Espectro de FTIR obtido para os pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel e para os pós de HAp comercializados pelo laboratório Biotál.	41
Figura IV.6: Difractograma obtido para os pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel (sinterizados a 600°C) e para os pós de HAp comercializados pelo laboratório Biotál.	43
Figura IV.7: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 393.15K (120°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade.	44

Figura IV.8: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade, antes e após a amostra ter permanecido 5 dias na estufa a 353.15K (80°C).	45
Figura IV.9: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade, antes e após ter permanecido 22 dias na estufa a 353.15K (80°C).	46
Figura IV.10: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de dois campos eléctricos DC de intensidade distinta (1 kV/cm e 140V/cm). ...	47
Figura IV.11: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 300.15K (27°C), para uma amostra de HAp comercial (Biotol) e uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. As amostras foram polarizadas sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm.	48
Figura IV.12: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 300.15K (27°C), para uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. A amostra foi polarizada sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm, durante um período de 9 horas.	49
Figura IV.13: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 310.15K (37°C), para uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. A amostra foi polarizada, durante 1 hora, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm.	49
Figura IV.14: Espectro de TSDC obtido, em atmosfera de ar, para uma amostra de HAp não polarizada.	50
Figura IV.15: Espectro de TSDC obtido, em atmosfera de árgon, para uma amostra de HAp não polarizada. ...	51
Figura IV.16: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAp polarizada a 50°C, durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico, E_p , de intensidade 1 kV/cm de intensidade, em vácuo e em atmosfera de ar e de árgon.	52
Figura IV.17: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAp polarizada a 323.15K (50°C), durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico, E_p , de intensidade $E_p = 1$ kV/cm, em atmosfera de árgon.	53
Figura IV.18: Espectros de TSDC obtidos uma amostra de HAp aquecida a 273.15K (200°C), durante 1h, e posteriormente polarizada a 323.15K (50°C), durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade $E_p = 1$ kV/cm, em atmosfera de ar e de árgon, com controlo do tempo (t_0) decorrido entre a remoção do campo eléctrico DC e o início do TSDC.	54
Figura IV.19: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAp polarizada a 393.15K (120°C), durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico DC de diferentes intensidades ($E_p = 1$ kV/cm e $E_p = 2$ kV/cm), em atmosfera de árgon.	55
Figura IV.20: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada a esta mesma temperatura, durante 1h, em atmosfera de árgon, sob a acção de campos eléctricos DC de diferente intensidade (20kV/cm, 10kV/cm e 5kV/cm), com $t_0 = 2h$	56
Figura IV.21: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas a 200°C sob a acção de campos eléctricos DC de intensidade 5kV/cm, 10kV/cm e 20kV/cm.	57

Figura IV.22: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada, durante 1h, a diferentes temperaturas, em atmosfera de árgon, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm, com $t_0=2h$.	59
Figura IV.23: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas a diferentes temperaturas sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm. ..	59
Figura IV.24: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada a esta mesma temperatura, 473.15K (200°C), em atmosfera de árgon, com diferentes tempos de polarização ($t_p=30$ minutos e $t_p=60$ minutos), sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm, com $t_0=2h$.	60
Figura IV.25: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas durante diferentes períodos ($t_p=30$ minutos e $t_p=60$ minutos) sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20 kV/cm.	61
Figura IV.26: Resposta de um material em frequência [Dias, 2009].	62
Figura IV.27: Espectros de DRS do ensaio 1 (a), ensaio 2 (b) e ensaio (3) da componente real, ϵ' , e da componente imaginária, ϵ'' , da permitividade em função da frequência, f , e temperatura, T , obtidos, em atmosfera de ar, para uma amostra de HAp.	64
Figura IV.28: Espectros de DRS da componente real, ϵ' , e da componente imaginária, ϵ'' , da permitividade em função da frequência, f , e temperatura, T , obtidos, em vácuo, para uma amostra de HAp.	65
Figura IV.29: Espectros de DRS da componente real, σ' , e da componente imaginária, σ'' , da condutividade em função da frequência [Hz] e temperatura [K] obtidos, em vácuo, para uma amostra de HAp.	65
Figura IV.30: Imagens de SEM obtidas para as amostras de HAp imersas em PBS durante 6h (a), 12h (b) e 2 dias (c).	67
Figura IV.31: Diagrama representativo da concentração de cálcio e fósforo, em mM, presente nas soluções de PBS onde as amostras de HAp, de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.	69
Figura IV.32: Imagens de SEM a) da superfície carregada negativamente e b) da superfície carregada positivamente da amostra de HAp imersa em PBS durante 3 dias.	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1: Efeitos da incorporação de silício, carbonato e flúor na superfície da HAp [Kovaleva, 2008; Patel, 2002].	5
Tabela I.2: pH e concentrações iónicas, em mM, da solução PBS e do plasma sanguíneo humano [adaptado de Jalota, 2008].	14
Tabela I.3: Vantagens e desvantagens do método sol-gel.....	18
Tabela IV.1: Efeito das condições de polarização (campos eléctricos DC de diferente intensidade) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.	58
Tabela IV.2: Efeito das condições de polarização (diferentes temperaturas de polarização) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.	60
Tabela IV.3: Efeito das condições de polarização (diferentes tempos de polarização) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.	61

O envelhecimento da população e a democratização do alto risco desportivo levaram a um aumento de doenças e fracturas ósseas. Como resultado, o uso de substitutos de enxerto ósseo aumentou drasticamente na última década [Bohner, 2010].

...todos os anos, cerca de dois milhões de pacientes em todo o mundo sustentam um procedimento de enxerto ósseo para reparação de defeitos ósseos decorrentes de uma doença ou um evento traumático...[Bohner, 2010]

Enquadramento, Objectivos e Estrutura da Dissertação

Enquadramento, Objectivos e Estrutura da Dissertação

O osso exibe um comportamento piezoelétrico, como tal desenvolve carga eléctrica sob a aplicação de tensão mecânica, pensando-se que tal comportamento influencia a actividade de formação óssea. A hidroxiapatite sintética é um composto que apresenta uma composição química semelhante à componente inorgânica dos tecidos ósseos, o que permite a sua utilização como material de substituição em medicina. A hidroxiapatite sintética é um fosfato de cálcio cerâmico que tem sido utilizado clinicamente e tem demonstrado apresentar propriedades como bioactividade, biocompatibilidade e osteocondutividade. Este biocerâmico interage com o osso hospedeiro libertando iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} para formar precipitados apatíticos no substrato cerâmico, processo este que estimula o crescimento ósseo e melhora a integração do material implantado com o tecido hospedeiro. É possível melhorar o comportamento da hidroxiapatite sintética no que respeita à sua integração óssea, induzindo cargas à sua superfície por polarização eléctrica. Recentemente, investigações demonstraram que polarizando a hidroxiapatite sintética, criando uma carga residual permanente em locais opostos do material, é possível melhorar a proliferação celular e a resposta das células envolventes ao material, permitindo uma melhor integração e cicatrização do implante. Numerosos estudos têm investigado a possibilidade de estimular electricamente o processo de implantação pelo estudo do efeito de cargas eléctricas na resposta biológica à hidroxiapatite polarizada. Tendo em atenção que, até à data, nenhum estudo sistemático foi realizado para comparar as propriedades eléctricas e dieléctricas da hidroxiapatite nanoestruturada e as suas relações com a bioactividade, foi objectivo principal deste trabalho fazer um estudo comparativo destas mesmas propriedades, com o objectivo final de compreender o efeito da polarização da hidroxiapatite na sua bioactividade.

O presente trabalho é resultado de investigação no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL e no CENIMAT/I3N. Encontra-se estruturado em cinco capítulos, apresentando o CAPÍTULO I uma introdução geral ao tema de modo a proporcionar uma melhor compreensão dos postulados associados a esta temática e, também, uma melhor compreensão dos procedimentos efectuados no decorrer da investigação. No CAPÍTULO II, por sua vez, encontra-se uma breve descrição sobre as técnicas de caracterização utilizadas e, no CAPÍTULO III, uma síntese dos procedimentos experimentais inerentes à realização do trabalho de investigação. No CAPÍTULO IV apresentam-se e discutem-se os principais resultados obtidos e, por último, no CAPÍTULO V, apresentam-se as conclusões mais relevantes, perspectivando-se algumas futuras importantes investigações na área.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CAPÍTULO I – Introdução

I.1 Osso

O osso e os vários elementos a ele associados (cartilagem, tecido conjuntivo, elementos vasculares, entre outros) actuam como um órgão funcional. São eles que fornecem suporte e protecção para os tecidos moles, agindo em conjunto com os músculos esqueléticos para possibilitar os movimentos do corpo. O osso consiste numa estrutura de tecido conjuntivo, relativamente rígida, estando a sua forma intimamente relacionada com a função que desempenha [Bayraktar, 1999; Li, 2008; White, 2007].

O osso caracteriza-se pela sua composição, estrutura cristalina, morfologia, tamanho de partícula e orientação, sendo a matriz orgânica (da qual fazem parte a água e o colagénio), a componente celular (nomeadamente osteoblastos e osteoclastos) e a componente mineral os seus três principais constituintes [Vallet-Regí, 2004]. De entre os vários constituintes minerais do osso destaca-se a hidroxiapatite, que representa cerca de 65% da sua composição total e constitui cerca de 90% do cálcio (Ca) e 80% do fósforo (P) total existente no corpo humano [Ferraz, 2004; Vallet-Regí, 2004]. A hidroxiapatite óssea organiza-se em cristais de tamanho nanométrico, com 50nm de comprimento médio, 25nm de largura e 2-5nm de espessura, dispersos numa matriz orgânica, sendo as reduzidas dimensões destes cristais um importante factor na solubilidade das apatites biológicas. Estas pequenas dimensões e a baixa cristalinidade são duas características distintas das apatites biológicas que, combinadas com a sua composição não estequiométrica e presença de iões carbonato na rede cristalina, permitem explicar o seu especial comportamento. A hidroxiapatite óssea apresenta-se carbonatada, com um teor em carbonatos entre 4% e 8%, aumentando esta percentagem ao longo dos anos [Vallet-Regí, 2004].

No que respeita à componente celular do osso são de referir os osteoblastos, células responsáveis pela permanentemente actividade de formação óssea que, completando este processo, se diferenciam em osteócitos que mantêm a homeostasia do osso [Vallet-Regí, 2004; Zhang, 2009]. Ainda no que respeita à actividade de formação óssea, Basset, em 1964 [Basset, 1964], baseado na piezoelectricidade óssea (secção I.4.1) descrita por Yasuda e Fukada [Fukada, 1957], defendeu que a estimulação eléctrica promove a formação óssea, levando esta descoberta ao surgimento da terapia eléctrica para lesões ósseas [in Tanaka, 2010].

1.2 Biomaterial

O avanço das sociedades modernas, aliado aos novos conhecimentos de diversas áreas da ciência e da engenharia e à crescente preocupação em proporcionar melhor qualidade de vida aos cidadãos, levou ao desenvolvimento de biomateriais, nomeadamente materiais sintéticos de enxerto ósseo, cuja aplicação envolve diversas áreas da medicina (dentária, ortopédica e cirurgia maxilofacial) [Bohner, 2009].

Biomaterial define-se, então, como um “material de origem natural ou sintética destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. A sua aplicação deve salvaguardar a manutenção das suas propriedades e características estruturais enquanto, simultaneamente, substitui a função para a qual foi criado. Deverá permitir uma boa adesão celular à sua superfície, ter uma resistência mecânica adequada, esterilizável e não apresentar características oncogénicas. O sucesso do biomaterial no organismo depende da sua capacidade em desempenhar a função do tecido ou órgão a substituir e da sua biocompatibilidade [Gutierrez, 2006].

1.3 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HAp) sintética, fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um biomaterial cerâmico e bioactivo, do grupo dos fosfato de cálcio (CaP), pertencente à família das apatites ($\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6\text{X}_2$, com $\text{A}=\text{Ca}$, $\text{B}=\text{P}$ e $\text{X}=\text{OH}$). Apresenta semelhanças com a componente mineral dos ossos e dentes naturais, tendo a capacidade de interagir quimicamente com o osso, tanto *in vivo* como *in vitro* [Bayraktar, 1999; Gittings, 2008].

A célula unitária deste biocerâmico, representada na Figura I.1, pertence ao sistema hexagonal, com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, e apresenta como parâmetros de rede $a=b=9.432\text{\AA}$ e $c=6.881\text{\AA}$. A estrutura cristalina da HAp consiste numa rede de dimensões nanométricas de iões hidróxilo (OH^-) localizados no centro de triângulos de Ca^{2+} junto ao eixo c da célula unitária hexagonal, encontrando-se os iões OH^- alinhados em colunas paralelas ao eixo c , juntamente com os iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} [Feki, 2000; Gittings, 2008].

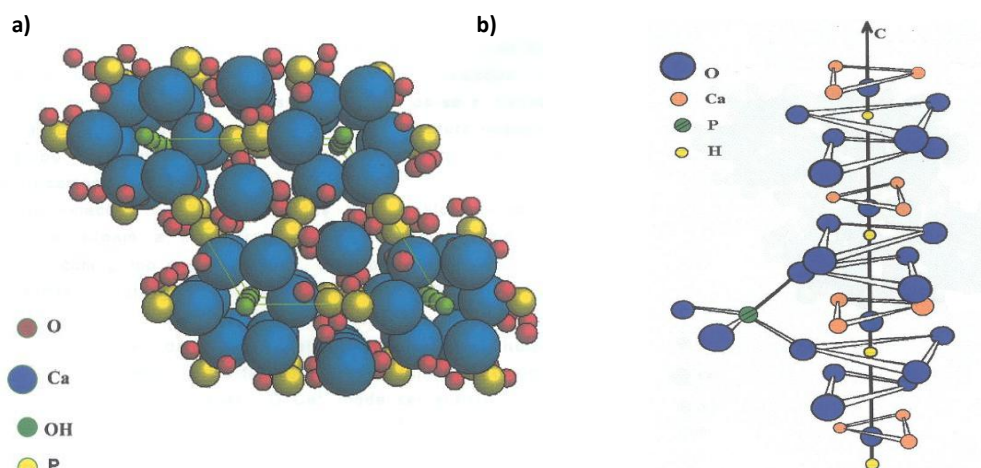


Figura I.1: a) Estrutura da hidroxiapatite – célula unitária; b) Estrutura da hidroxiapatite ao longo do eixo c [Monte, 2003].

Sabe-se que, na realidade, a composição química da hidroxiapatite biológica, embora seja variável ao longo da vida, não possui a fórmula estequiométrica descrita anteriormente ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sendo uma apatite deficiente em cálcio, habitualmente enriquecida com outros iões devido à sua facilidade em acomodar uma ampla variedade de substituições [Bayraktar, 1999; Gittings, 2008]. Tais substituições afectam propriedades como a bioactividade, biocompatibilidade, solubilidade e velocidade de degradação da HAp [Kheradmandfard, 2010]. Substituições iónicas recorrentes na HAp biológica envolvem a incorporação de iões como o carbonato (CO_3^{2-}), podendo também existir a incorporação de silício (Si), magnésio (Mg), flúor (F), cloro (Cl) e outros elementos. Na Figura I.2 encontra-se representada a fórmula química da hidroxiapatite estequiométrica bem como as substituições passíveis de ocorrer nos grupos hidróxilo (OH^-), fosfato (PO_4^{3-}) e cálcio (Ca^{2+}) [Matsumoto, 2007].

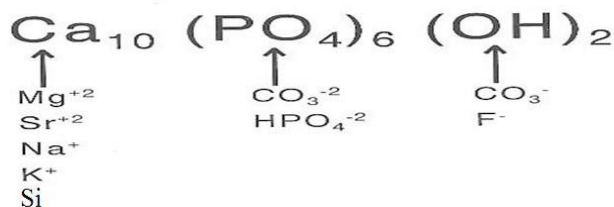


Figura I.2: Fórmula química da hidroxiapatite estequiométrica e possíveis substituições iónicas dos grupos hidróxilo (OH^-), fosfato (PO_4^{3-}) e cálcio (Ca^{2+}) [adaptado de Matsumoto, 2007].

Na Tabela I.1 encontra-se descrita a influência da incorporação de silício, carbonato e flúor na HAp estequiométrica.

Tabela I.1: Efeitos da incorporação de silício, carbonato e flúor na superfície da HAp [Kovaleva, 2008; Patel, 2002].

Grupos substituintes	Efeitos da incorporação dos grupos substituintes na superfície da HAp
Silício	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumenta a velocidade de degradação da HAp ▪ Melhora a bioactividade da HAp ▪ Influencia significativamente a taxa e padrão de formação óssea (isto é, afecta de forma directa os processos fisiológicos do tecido esquelético)
Carbonato	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumenta a velocidade de degradação da HAp ▪ Melhora a osteointegração
Flúor	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diminui a velocidade de degradação da HAp ▪ Altera a adesão e orientação das proteínas de ligação ao cálcio ▪ Altera a adesão celular

A ocorrência de substituições iónicas na hidroxiapatite estequiométrica leva a alterações na sua rede, influenciando a simetria apresentada pelos cristais. Existem duas fases distintas dos cristais de HAp: a simetria hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$, típica da hidroxiapatite sintética e da fluoroapatite $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$, e a simetria monoclinica com grupo espacial $P2_1/b$, típica da cloroapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$. Apesar da transição de fase da estrutura monoclinica para a hexagonal ocorrer por volta dos 480 K [Gittings, 2009; Tofail, 2005], a simetria hexagonal é estável mesmo à temperatura ambiente, uma vez que a simetria monoclinica exige uma exacta composição estequiométrica, encontrando-se esta diferença entre as fases, hexagonal e monoclinica, relacionada com a ordem/desordem dos protões em torno dos iões OH^- [Tanaka, 2010]. As substituições iónicas na hidroxiapatite natural vão diminuindo ao longo da vida e a sua estrutura vai-se aproximando da forma estequiométrica, apresentando-se cada vez mais cristalina. Este aumento da cristalinidade da HAp com o decorrer dos anos leva a diferenças na velocidade de remodelação do tecido ósseo que se resumem, de um modo geral, a uma diminuição da velocidade de degradação que resulta numa menor actividade de remodelação óssea [Kovaleva, 2008; Rho, 1998]. A constante procura de materiais com uma velocidade de degradação adequada justifica a tentativa de utilização de fosfatos de cálcio com diferentes relações cálcio/fósforo (Ca/P). De facto, diferentes estudos demonstraram que a taxa de

degradação dos fosfatos de cálcio diminui com o aumento da relação Ca/P. No que respeita à velocidade de degradação de alguns fosfatos de cálcio verifica-se a seguinte relação:

HAp amorfa > α -TCP (fosfato de tricálcio com estrutura monoclinica) > β -TCP (fosfato de tricálcio com estrutura romboédrica) > HAp cristalina (estrutura hexagonal) [Ducheyne, 1993].

Também a actividade celular provoca a dissolução parcial dos fosfatos de cálcio (CaP) da HAp. Os iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} libertados para o meio aumentam a já existente supersaturação dos fluidos biológicos o que, por sua vez, leva à precipitação de apatites carbonatadas, semelhantes às do tecido ósseo. Estas apatites carbonatadas, que se formam na superfície dos biomateriais à base de CaP, facilitam a adesão de proteínas do meio, levando a uma maior adesão, proliferação e diferenciação por parte das células osteogénicas, que reconhecem um ambiente biologicamente mais natural. Deste modo, ocorre com mais facilidade a produção de uma matriz extracelular biomineralizada, exercendo esta camada de apatite carbonatada uma importante actividade osteocondutora que contribui para uma melhor performance biológica do biomaterial [Christoffersen, 1997; Rho, 1998; Zhang, 2010].

1.3.1 Comportamento biológico da HAp

Características como a sua bioactividade, biocompatibilidade e osteocondução fazem com que a HAp seja considerada um material de eleição no campo da substituição/reparação óssea [Gittings, 2009; Kheradmandfard, 2010]. Entende-se por biocompatibilidade a ausência de reacções adversas por parte do hospedeiro à HAp, o que resulta numa resposta adequada que, efectivamente, melhora a força de ligação entre este biomaterial e o tecido ósseo e/ou dentina. Por sua vez, bioactividade, de acordo com a definição de Kokubo e Takadama [Kokubo, 2006], é a capacidade que um material tem de formar, selectivamente, hidroxiapatite semelhante à existente no osso após imersão do mesmo numa solução simuladora de fluído corporal [Bohner, 2009]. Finalmente, osteocondução é a capacidade da HAp para adsorver factores de crescimento osteogénico e criar condições adequadas ao local, permitindo a fixação e proliferação de vários tipos de células, bem como a formação de novo osso à sua superfície, promovendo a adesão da matriz [Zhang, 2010]. Para além das propriedades acima descritas, a HAp é, ainda, não tóxica e não imunogénica [Bohner, 2010], apresentando características de biodegradabilidade/reabsorbilidade, uma vez que se degrada aquando da sua implantação no hospedeiro, sendo substituída por tecido endogénico [Bronzino, 2003; Li, 2008].

Contudo, importa referir que, apesar destas propriedades, a HAp sintética encontra a sua aplicação limitada devido às fracas propriedades mecânicas que apresenta [Kheradmandfard, 2010].

I.3.1.1 Reabsorção/Biodegradação da HAp

Actualmente, a reabsorção da HAp sintética encontra-se, ainda, pouco documentada sendo que os estudos publicados apresentam evidências científicas divergentes relativamente a esta temática. Deste modo, certos autores apontam para uma reabsorção da HAp sintética pelos osteoclastos, enquanto que outros estudos negam esta hipótese. Investigadores relacionam a capacidade de reabsorção dos materiais à base de fosfato de cálcio com a solubilidade do material em questão. Outros estudos demonstraram que os osteoclastos são células muito sensíveis às concentrações de Ca^{2+} (intra e extracelular), existindo uma relação directa entre a concentração de Ca^{2+} e a actividade osteoclástica (o aumento deste ião inibe a adesão osteoclástica e a actividade de reabsorção) [Detsch, 2008].

No que respeita à degradação da HAp, esta realiza-se mediante processos químicos de dissolução ou como consequência da actividade celular. O processo de dissolução química, não associado aos osteoclastos, parece assentar no facto dos líquidos biológicos onde se encontra o biomaterial atingirem, com frequência, um pH ácido, resultante dos produtos de degradação metabólica. Por sua vez, a actividade celular recorrente dos processos de biodegradação, pode envolver monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas com capacidades macrofágicas, assim como os típicos osteoclastos normalmente envolvidos nos mecanismos de reabsorção de matriz óssea. De entre estas células, a degradação levada a cabo pelos osteoclastos é nitidamente favorável, dada a sua semelhança com o processo fisiológico de reabsorção da matriz óssea. Estas células criam superfícies com características ideais para o desenvolvimento e diferenciação de células osteoblásticas e estruturas vasculares, sendo capazes de, em simultâneo, reabsorver materiais cerâmicos de fosfato de cálcio através da criação de lacunas acídicas de reabsorção ou através de processos de fagocitose. Por outro lado, a actividade dos osteoclastos sobre a HAp sintética parece estar bastante dependente das características intrínsecas do biomaterial, entre as quais o tamanho e forma dos cristais (a micro e a nanocristalinidade promovem o processo de reabsorção), a *molhabilidade* (capacidade de manter contacto com o meio líquido envolvente) e a rugosidade da sua superfície (as superfícies rugosas parecem mais favoráveis à interacção com os osteoclastos) [Wenisch, 2003].

As propriedades biofuncionais e biomecânicas do local de implantação são também importantes factores a considerar na reabsorção/biodegradação dos biomateriais. De facto, investigadores utilizando modelos animais, demonstraram que um mesmo biomaterial, colocado em zonas sujeitas à acção de diferentes forças mecânicas, têm comportamentos diferentes, apresentando as áreas sujeitas a maiores forças mecânicas uma maior, e mais rápida, reabsorção, a par de uma extensa

remodelação óssea. Finalmente, também a temperatura de sinterização e os mecanismos de esterilização a que foram sujeitos os biomateriais podem influenciar a sua reabsorção/biodegradação [Merkx, 1999].

1.3.1.2 Importância da porosidade nos cerâmicos de HAp para aplicações biomédicas

A porosidade afecta as propriedades físicas dos biocerâmicos de hidroxiapatite, entre as quais o módulo elástico [Galassi, 2006]. No entanto, apesar das desvantagens associadas, para aplicações biomédicas de substituição óssea e matrizes para engenharia dos tecidos, são favorecidos os materiais porosos, com poros de tamanho adequado e interconexões suficientes para que material biológico como células, vasos sanguíneos e matrizes extracelulares possam penetrar na cerâmica, permitindo que novos tecidos se possam regenerar não apenas à volta da superfície mas também no seu interior [Wang, 2009; Iwasaki, 2008].

1.4 Propriedades Eléctricas e Dieléctricas: Fundamentos

A interacção dos campos electromagnéticos com a matéria é descrito pelas equações de Maxwell:

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.1)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (1.2)$$

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho_e \quad (1.3)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (1.4)$$

onde \vec{E} e \vec{H} descrevem o campo eléctrico e o campo magnético, respectivamente, \vec{D} o deslocamento dieléctrico, \vec{B} a indução magnética, \vec{j} a densidade de corrente e ρ_e a densidade de carga eléctrica. Para campos eléctricos de fraca intensidade, \vec{D} pode ser expresso como

$$\vec{D} = \epsilon^* \epsilon_0 \vec{E} \quad (1.5)$$

sendo ϵ_0 a permissividade dieléctrica no vácuo ($\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$) e ϵ^* a permissividade dieléctrica relativa do material. De acordo com as equações de Maxwell, ϵ^* é dependente do tempo

(ou frequência), se processos dependentes do tempo ocorrerem na amostra. Em geral, os processos dependentes do tempo que ocorrem num material conduzem a diferenças no campo eléctrico externo $\vec{E}(t)$ e no resultante deslocamento dieléctrico $\vec{D}(t)$. Para um campo eléctrico periódico, $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \exp(-i\omega t)$, onde ω é a frequência (em radianos/segundos), a permitividade dieléctrica é definida por

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega), \quad (1.6)$$

sendo $\varepsilon'(\omega)$ e $\varepsilon''(\omega)$, respectivamente, a parte real (associada à componente capacitiva) e a parte imaginária (associada à componente resistiva) da permitividade dieléctrica.

Os fenómenos de relaxação estão relacionados com flutuações moleculares dos dipolos devido a moléculas, ou parte delas. Além disso, o movimento de partículas carregadas (electrões, iões ou defeitos carregados) contribuem para a resposta dieléctrica. O deslocamento dieléctrico que tem origem na resposta do material à aplicação de um campo eléctrico externo é descrito pela polarização \vec{P} :

$$\vec{P} = \vec{D} - \vec{D}_0 = (\varepsilon^* - 1)\varepsilon_0 \vec{E} = \chi^* \varepsilon_0 \vec{E}, \quad (1.7)$$

representando $\chi^* = (\varepsilon^* - 1)$ a susceptibilidade dieléctrica do material sob a influência de um campo eléctrico externo.

Recorrendo à relação

$$\vec{j} = \sigma^* \vec{E}, \quad (1.8)$$

é possível obter-se uma relação entre o campo eléctrico, \vec{E} , e a densidade de corrente, \vec{j} , onde

$\sigma^*(\omega) = \sigma'(\omega) + i\sigma''(\omega)$ é a condutividade eléctrica, representando σ' a parte real e σ'' a parte imaginária da mesma. Substituindo na expressão (1.3), de acordo com as equações (1.2) e (1.5):

$$\sigma^* = i\omega\varepsilon_0\varepsilon^* \quad (1.9).$$

Em geral, uma polarização macroscópica, \vec{P} , relaciona-se com um momento dipolar microscópico, \vec{p}_i , de moléculas ou partículas num volume, V , pela expressão

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum \vec{p}_i \quad (1.10)$$

representando o índice i todos os momentos dipolares do sistema. Moléculas (ou partículas) têm momentos dipolares se os centros eléctricos de gravidade das cargas positivas e negativas não coincidem (o caso mais simples é dado por uma carga pontual positiva, $+q$, e uma carga pontual negativa, $-q$, separadas a uma distância \vec{d} , com um momento dipolar $\vec{p} = q\vec{d}$). Para qualquer distribuição de cargas $\rho_e(\vec{r})$, o momento dipolar pode ser expresso por:

$$\vec{p} = \int_V \vec{r} \rho_e(\vec{r}) d^3 r \quad (I.11).$$

O momento dipolar microscópico pode apresentar carácter permanente ou induzido. No que respeita ao momento dipolar induzido (que se verifica, por exemplo, na polarização electrónica) este é provocado por um campo eléctrico local, \vec{E}_{Loc} , que altera a distribuição neutra das cargas. No caso linear tem-se que $\vec{p} = \alpha \vec{E}_{Loc}$, onde α é a polarizabilidade (medida da mobilidade das cargas positivas e negativas). No entanto, muitas moléculas têm um momento dipolar permanente, $\vec{\mu}$, que pode ser orientado pela acção de um campo eléctrico. Então, para sistemas que apresentam apenas um tipo de dipolos, a equação (I.10) toma a forma

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i + \vec{P}_\infty = \frac{N}{V} \langle \vec{\mu} \rangle + \vec{P}_\infty \quad (I.12)$$

onde N representa o número total de dipolos no sistema, \vec{P}_∞ a polarização induzida e $\langle \vec{\mu} \rangle$ o momento dipolar médio [Kremer, 2002].

I.4.1 Piezoelectricidade

A piezoelectricidade, Figura I.3, propriedade exibida apenas por alguns sólidos (nomeadamente cerâmicos), consiste na acumulação de carga eléctrica resultante da resposta à aplicação de uma força mecânica sobre o material. O efeito piezoeléctrico apresenta-se reversível, uma vez que os materiais piezoeléctricos podem ser alvo de alguma deformação quando sujeitos à acção de um campo eléctrico [Callister, 2011]. Esta propriedade, observada no osso por Yasuda e Fukada [Fukada, 1957], tem sido estudada na HAp com o intuito de compreender as suas características bioactivas [Yamashita, 1996].

Alguns estudos atribuíram a piezoelectricidade dos ossos à água incorporada e às fibras de colagénio. Porém, estudos efectuados posteriormente por correntes termicamente estimuladas, revelaram que a polarização da hidroxiapatite origina a reorientação dos momentos dipolares existentes entre os iões O^{2-} e H^+ da rede de iões OH^- [Bowen, 2006; Gittings, 2007; Iwasaki, 2008].

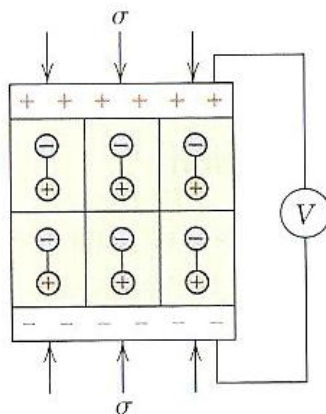


Figura I.3: Tensão gerada quando um material piezoelétrico é sujeito a forças de compressão [Callister, 2011].

I.4.1.1 Comportamento eléctrico da HAp

Actualmente, sabe-se que a HAp sintética possui uma fraca capacidade osteogénica quando comparada com a apresentada pelo tecido ósseo. Após a sua implantação, a HAp sintética pode levar dias, ou até mesmo semanas, para começar o processo de mineralização do tecido ósseo, conduzindo a grandes defeitos/lesões como consequência deste facto [Wang, 2009]. Como tal, tem-se assistido a um crescente interesse no desenvolvimento de novos materiais cerâmicos de HAp que estimulem o crescimento do novo osso a uma taxa mais acelerada, conduzindo a uma recuperação mais rápida do paciente. Muito esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de biomateriais à base de hidroxiapatite, com adesão e adsorção adaptadas, através da modificação da superfície da HAp [Bodhak, 2009]. De entre as possíveis modificações, a polarização da superfície da HAp é a que apresenta respostas mais marcantes a nível biológico. A polarização de HAp sinterizada induz momentos dipolares no biocerâmico, formando cargas estáveis na sua superfície com pequenas alterações na estrutura do cristal [Kokubo, 2006]. Esta polarização é conseguida através da aplicação de tensão em superfícies opostas da amostra, criando-se grandes superfícies de cargas eléctricas residuais permanentes de 10^{-8} – 10^{-3} C/cm², em lados opostos do material, tal como se demonstra na Figura I.4 [Nakamura, 2009].

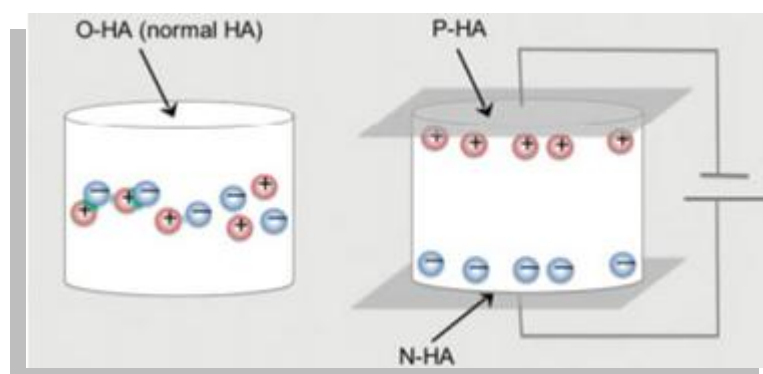


Figura I.4: Polarização da HAp pela aplicação de um campo eléctrico [Nakamura, 2009].

Estudos realizados por Nakamura et. al [Nakamura, 2001] demonstraram que, uma vez polarizada, a HAp mantém a densidade de corrente praticamente inalterada durante um longo período de tempo, dado o lento processo de relaxação deste biocerâmico à temperatura biológica.

Contudo, a resposta da HAp à aplicação de um campo eléctrico é extremamente complexa e não pode ser avaliada de modo independente, pois existem evidências científicas da sua relação com a porosidade e humidade [Hoepfner, 2002], temperatura [Zakharov, 2001], entre outros factores. Yamashita et. al [Yamashita, 1996] demonstraram que as condições de polarização eléctrica permitem acelerar ou desacelerar o crescimento de cristais apatíticos em cerâmicos de HAp polarizados. Estes mesmos investigadores verificaram que as superfícies de HAp carregadas, positiva e negativamente, exibem diferentes níveis de actividade das células de reabsorção (osteoclastos) e formação (osteoblastos) óssea [Yamashita, 1996]. No que se refere aos níveis de actividade dos osteoclastos, numerosos estudos têm investigado o efeito de cargas eléctricas e tensões na resposta biológica à HAp polarizada não existindo, no entanto, consenso na literatura quanto a qual das cargas superficiais, positiva ou negativa, é mais benéfica para tal resposta. Alguns autores relatam que o crescimento ósseo é acelerado nas superfícies carregadas negativamente e desacelerado nas superfícies carregadas positivamente [Gittings, 2009]. Contudo, outros autores afirmam que o crescimento ósseo aumenta nas superfícies de HAp carregadas, independentemente da polaridade da carga [Kumar, 2010].

I.4.1.2 Mecanismo de condução na HAp

O mecanismo geral da condução eléctrica na HAp continua por clarificar. Diferentes espécies iónicas têm sido apontadas como estando envolvidas neste mecanismo, nomeadamente protões (H^+), iões óxido (O^{2-}) e iões hidróxido (OH^-) [Tanaka, 2010; Ueshima, 2002]. Nagai e Nishino [Nagai, 1988] propuseram que tanto os protões, H^+ , como os iões OH^- são espécies condutoras na HAp. Estes

autores sugeriram que a condução, à temperatura ambiente, ocorre devido à migração dos protões na água adsorvida e que, a temperaturas elevadas, é o grupo hidróxilo, OH^- , quem contribui para a condução eléctrica. Por sua vez, Yamashita [Yamashita, 1995] defendeu que a condução eléctrica na HAp é impulsionada por protões móveis, transportados através dos canais de OH^- , com energias de activação suficientemente elevadas que impedem o seu retorno à posição de equilíbrio à temperatura ambiente. No entanto, Khalil et al. [Khalil, 2002] questionaram a validade dos resultados obtidos por Yamashita, propondo que a condução eléctrica ocorre devido à migração dos iões OH^- , que estão no centro dos triângulos formados pelos iões Ca^{2+} , alinhados com o eixo c. Finalmente, Laghizil et al. [Laghizil, 2001] consideraram dois mecanismos de condução protónica distintos: i) uma condução protónica entre dois iões OH^- vizinhos, de acordo com a reacção: $\text{OH}^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{O}^{2-} + \text{HOH}$; ii) e um salto protónico do primeiro ião OH^- para o seguinte, via iões PO_4^{3-} , de acordo com a reacção: $2\text{OH}^- + [\text{PO}_4]^{3-} \rightarrow \text{O}^{2-} + [\text{HPO}_4]^{2-} + \text{OH}^- \rightarrow \text{O}^{2-} + [\text{PO}_4]^{2-} + \text{HOH} + \square_{\text{OH}^-}$, onde \square_{OH^-} indica a vaga que fica no ião OH^- . Este último mecanismo é proposto dada a distância existente entre iões OH^- adjacentes (0,344nm), sendo favorecida a interacção protónica com a vizinhança dos iões PO_4^{3-} (0,307nm).

1.4.2 Precipitação de cristais apatíticos na superfície da HAp imersa em soluções simuladoras do fluido biológico

De acordo com a definição de bioactividade, o requisito essencial para que um material artificial se ligue ao osso vivo consiste na possibilidade que o material apresenta para formar, à sua superfície, apatites semelhantes ao osso [Kokubo, 2006]. Desde o primeiro uso de soluções simuladoras do fluído corporal que diversos investigadores têm demonstrado interesse nestas soluções para precipitação de fosfatos de cálcio bioactivos [Juhász, 2008].

Desde a década de 1980 que tem sido explorado o uso de soluções simuladoras do fluído corporal para o estudo da bioactividade da HAp, com o intuito de simular condições *in vivo* em ambientes *in vitro*. Utilizando estas soluções é possível reproduzir-se a formação de apatites que ocorre em processos *in vivo*, ou seja, prever-se a bioactividade óssea de um dado material [Bohner, 2009; Kokubo, 2006]. Uma vez imersa em soluções semelhantes ao plasma sanguíneo, a HAp inicia o seu processo de dissolução (fortemente dependente da cristalinidade – secção 1.3), promovendo a precipitação de cristais apatíticos na sua superfície. Segundo Marques [Marques, 2003], o Ca^{2+} , o PO_4^{3-} e o H^+ são as espécies mais importantes para o processo de nucleação, como tal é necessário

que se encontrem presentes na solução teste. Na Tabela I.2 encontram-se as concentrações, em mM, dos iões presentes no plasma sanguíneo e na solução *PBS* (*Phosphate Buffer Solution*) utilizada nos testes de bioactividade realizados no presente trabalho de investigação.

Tabela I.2: pH e concentrações iónicas, em mM, da solução PBS e do plasma sanguíneo humano [adaptado de Jalota, 2008].

	Ião	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	pH
Concentração [mM]	PBS	153.2	4.2	0.5	0.9	142.5	-	8.1	-	7.4
	Plasma Sanguíneo	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27	1.0	0.5	7.4

I.4.2.1 Importância das proteínas no crescimento de apatites na superfície de cerâmicos de HAp

O papel de proteínas específicas na formação de cristais de HAp tem sido intensamente estudado e a sua influência no processo de biomineralização foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro* [Planeix, 2003; Zhang 2010]. De facto, o sangue humano contém várias proteínas, sendo a fibrinogénio e a albumina as mais abundantes. Estas duas proteínas são, geralmente, as primeiras a entrar em contacto com o implante, seguindo-se-lhes proteínas extracelulares mais específicas, como sejam a osteonectina, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina. Estas últimas, uma vez adsorvidas pelo implante, promovem a adesão celular e a formação de apatite óssea, controlando as interacções que ocorrem durante a formação óssea e desempenhando um importante papel no posterior crescimento, orientação e organização dos cristais minerais. Dado isto, na aplicação de materiais de substituição/reparação óssea, pretende-se uma imediata adsorção de proteínas à sua superfície [Juhász, 2008; Zhang, 2009].

1.5 Processo Sol-Gel

Como referido anteriormente, a hidroxiapatite sintética é um biomaterial de extrema importância para aplicações médicas [Weng, 1996]. Por esta razão, numerosos métodos foram desenvolvidos para sintetizar pós de HAp de tamanho submícron a nano, dos quais se destacam as reacções de estado sólido, a precipitação húmida, as reacções hidrotérmicas, o sol-gel e a decomposição térmica [Feng, 2005; Silva, 2009].

Apesar dos inúmeros métodos alternativos, tem sido a síntese de hidroxiapatite pelo método sol-gel que tem recebido, actualmente, maior atenção [Fathi, 2007]. Este método, esquematizado na Figura 1.5, é um método químico aquoso que, devido à alta reactividade do pó obtido, não necessita de um valor elevado de pH, nem de elevada temperatura de sinterização, para que ocorra a formação de hidroxiapatite, o que resulta na ausência de fenómenos de degradação durante a sinterização [Fathi, 2007; Feng, 2005; Rajabi-Zamani, 2008]. O método sol-gel proporciona uma mistura molecular de cálcio e fósforo capaz de melhorar a homogeneidade química e permite a preparação de pós altamente puros, devido à possibilidade de um cuidadoso controlo dos parâmetros do processo. Deste processo resultam cristais de tamanho submícron a nano que favorecem a reacção de contacto e a estabilidade da interface osso artificial/osso natural [Feng, 2005; Santos, 2005].

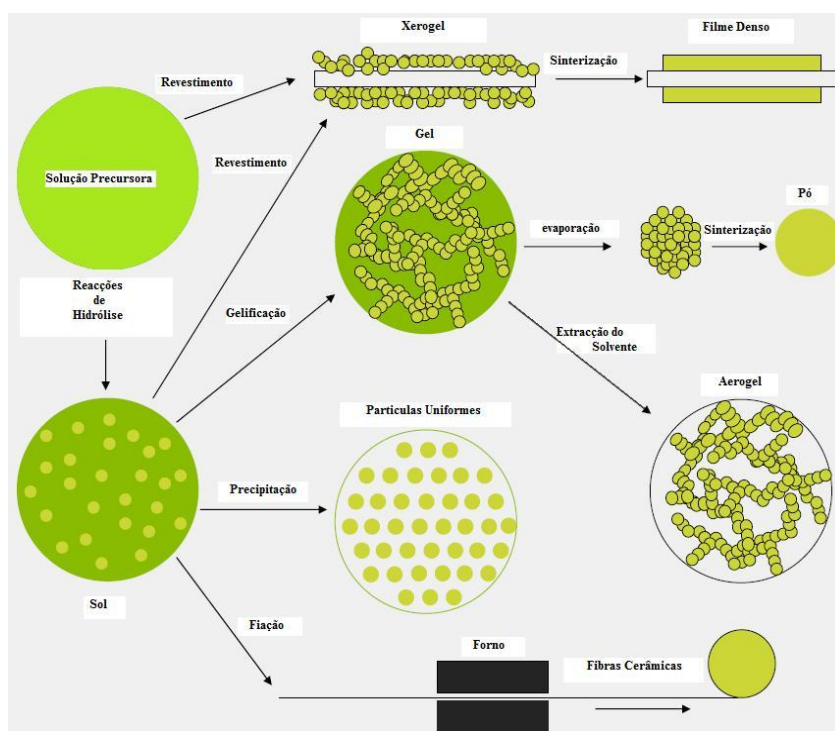


Figura 1.5: Método sol-gel [adaptado de CENTEXBEL].

I.5.1 Etapas do processo sol-gel

Tipicamente, o método sol-gel realiza-se em cinco principais etapas:

- i) Formação da solução inicial/sol;
- ii) Formação do gel;
- iii) Envelhecimento;
- iv) Secagem;
- v) Sinterização ou densificação.

I.5.1.1 Formação da solução inicial/sol

A primeira etapa do processo sol-gel consiste na formação do sol, suspensão coloidal onde a fase dispersa é constituída por partículas de tamanhos compreendidos entre 1nm e 1 μ m, podendo a solução que lhe dá origem ser preparada com uma composição variada de compostos metalo-orgânicos, polímeros e soluções iónicas [Franco, 2009].

I.5.1.2 Formação do gel

Nesta etapa, a estrutura de sol passa para uma estrutura de gel, que consiste numa rede tridimensional porosa sólida. O processo de gelificação ocorre por intermédio de reacções químicas entre as moléculas precursoras, mudanças químicas na solução ou por evaporação do solvente e resulta numa mudança no comportamento viscoelástico. No decorrer deste processo, a dispersão homogénea inicial torna-se rígida, perdendo a sua homogeneidade e estabilidade. O sol, ou solução de partida, é, então, transformado num gel coloidal ou polimérico, consoante ocorra agregação de partículas coloidais por modificação das condições físico-químicas da suspensão ou ocorra a formação de estruturas tridimensionais com base em ligações covalentes de cadeias poliméricas lineares. Caso existam reacções químicas incompletas no final da formação do gel, elas continuarão na etapa seguinte (envelhecimento) reforçando, deste modo, a rede [Franco, 2009; Luz, 2007].

I.5.1.3 Envelhecimento

Formado o gel, torna-se necessária a evaporação do solvente do interior dos poros do gel, denominando-se esta etapa de envelhecimento. No decorrer do envelhecimento é comum a ocorrência de processos de hidrólise responsáveis pela quebra das cadeias e diminuição do seu peso

médio. Durante esta etapa, mecanismos como a polimerização, espessamento e transformação de fase podem alterar as propriedades físicas do gel [Franco, 2009].

I.5.1.4 Secagem

No processo de secagem remove-se o solvente do gel, geralmente de carácter amorfo, resultando numa contracção do material. Tal remoção pode ser efectuada por diversos métodos, que levam ao aparecimento de diferentes tipos de microestruturas, de entre as quais se destacam os aerogéis (que têm lugar quando ocorre extracção do solvente) e os xerogéis (aquando da evaporação natural do solvente). No decorrer deste processo o gel encolhe numa proporção igual ao volume de líquido que evapora, permanecendo a interface líquido/vapor na superfície exterior do corpo do cerâmico. Devido à diminuição do líquido no interior, o material torna-se rígido e os poros próximos da superfície enchem-se de ar, provocando a contínua entrada de ar na estrutura um fluxo contínuo de um filme líquido para o exterior, continuando a evaporação na superfície do material. Porém, o líquido pode ficar individualizado em bolsas verificando-se secagem apenas por evaporação do líquido de dentro do material ocorrendo, simultaneamente, difusão do vapor para o exterior [Franco, 2009].

I.5.1.5 Sinterização

Finalmente, na última etapa do processo sol-gel realiza-se a sinterização, processo impulsionado pela energia interfacial, onde o material se desloca num fluxo viscoso ou por difusão em cristais. Como os géis são amorfos, o principal mecanismo nesta etapa é o fluxo viscoso, que consiste num processo mais rápido que a difusão em cristais.

Os processos de desidroxilação estrutural e relaxamento que ocorrem durante a sinterização levam a aquecimentos mais rápidos permitindo, por sua vez, sinterizações a temperaturas mais baixas. A baixas temperaturas ($\approx 150^{\circ}\text{C}$), o solvente, normalmente água adsorvida fisicamente e moléculas fracamente ligadas, evapora. Por sua vez, a temperaturas acima dos 250°C , a rede molecular decompõe-se por pirólise (ruptura da estrutura molecular original por acção do calor), ocorrendo libertação de compostos voláteis responsáveis pela perda de peso [Franco, 2009; Luz, 2007].

I.5.2 Vantagens e Desvantagens do método Sol-Gel

Na Tabela I.3 encontram-se resumidas as principais vantagens e desvantagens inerentes à utilização do método sol-gel, algumas das quais já mencionadas anteriormente.

Tabela I.3: Vantagens e desvantagens do método sol-gel.

V a n t a g e n s	<ul style="list-style-type: none">• Permite a combinação de compostos orgânicos e inorgânicos [Weng, 1998];• Não requer agitação vigorosa nem elevado tempo para que ocorra a hidrólise dos reagentes, formando-se o gel sem recurso a catalisadores [Fathi, 2007];• Para além de gerar pós nanocristalinos, permite ainda a obtenção de sólidos monolíticos amorfos e filmes finos [Kim, 2005];• Baixa temperatura de sinterização quando comparada com a temperatura a que ocorre esta etapa em processos convencionais de produção de cerâmicos [Fathi, 2007];• Diminuição considerável das interações químicas entre o material e as paredes do recipiente [Franco, 2009];• Permite controlar a forma e tamanho das partículas, a sua distribuição e a porosidade do material final modificando a química dos precursores e controlando as reacções de hidrólise e condensação [Franco, 2009];• Permite a obtenção de hidroxiapatite para revestimentos, uma vez que a alta temperatura necessária para a formação da hidroxiapatite utilizada noutros métodos de síntese impede a sua aplicação como um revestimento de superfície bioactivo sobre alguns substratos metálicos utilizados na medicina para a reparação óssea, sendo estes cristais melhor aceites pelo tecido hospedeiro [Fathi, 2007; Weng, 1996].
----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Desvantagens

- Elevado custo da matéria-prima, como é o caso dos alcóxidos [Fathi, 2007];
- Elevados tempos de secagem e envelhecimento [Franco, 2009].

Em particular, no método sol-gel utilizado no presente trabalho para a produção de hidroxiapatite, algumas das desvantagens apresentadas anteriormente podem ser negligenciadas, uma vez que não foi efectuado o envelhecimento do gel e os precursores utilizados não foram alcóxidos. Relativamente às vantagens apresentadas por este método podemos afirmar que a sua utilização permite a obtenção de um pó altamente puro (devido à possibilidade de um cuidadoso controlo dos parâmetros do processo) [Franco, 2009; Santos, 2005], minimiza a formação de produtos secundários (como por exemplo CaO e β -TCP) [Franco, 2009], oferece uma mistura molecular de Ca/P capaz de melhorar a homogeneidade química da HAp [Feng, 2005; Rajabi-Zamani, 2008], não necessita de um valor elevado de pH nem de altas temperaturas de sinterização para que ocorra a formação de hidroxiapatite [Fathi, 2007; Feng, 2005] e, uma vez que os cristais de HAp resultantes apresentam tamanho submícron a nano, a utilização deste método favorece a reacção de contacto e a estabilidade da interface osso artificial / osso natural [Kim, 2005; Santos, 2005].

CAPÍTULO II

Técnicas de Caracterização da Amostra

CAPÍTULO II – Técnicas de Caracterização da Amostra

II.1 *Análise Morfológica e Estrutural*

II.1.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia electrónica (ME) é o ramo da microscopia que recorre a interações entre um feixe de electrões altamente energético e a amostra para extrair informações morfológicas do material em estudo. Mediante a utilização da técnica de microscopia electrónica de varrimento, MEV (ou, do inglês, *Scanning Electron Microscopy* - SEM), é possível observar e caracterizar materiais heterogéneos orgânicos ou inorgânicos numa escala nano (nm) ou micrométrica (μm), devido à sua grande profundidade de campo. Comparando esta técnica de microscopia com a microscopia óptica, a técnica de SEM apresenta um elevado poder de ampliação (de 10 a 10000 vezes) e resolução (actualmente superior a 5\AA) possibilitando, assim, a caracterização elementar do material [Amenlinckx, 1997].

O princípio físico de funcionamento do SEM baseia-se na incidência de um feixe de electrões altamente acelerados, na área da amostra a ser observada, que interagem com a matéria gerando um conjunto de sinais (entre os quais electrões secundários, electrões retrodifundidos, electrões de Auger, raios-X característicos e outros fotões de várias energias) que são captados por detectores apropriados. Os detectores convertem estes sinais em sinais eléctricos que, ao terem intensidades variáveis, modulam a intensidade do feixe de electrões que forma a imagem no tubo de raios catódicos. Para a formação da imagem em SEM, os electrões secundários e retrodifundidos são os de maior relevância, uma vez que interagem na zona superficial da amostra. As energias tipicamente envolvidas neste processo variam entre 0.5keV e 50keV e a intensidade da emissão depende da natureza química da amostra, sendo que metais com electrões fracamente ligados emitem melhor que substâncias que possuam electrões mais fortemente ligados aos átomos, como é o caso dos compostos orgânicos. Dado isto, nestes últimos materiais, torna-se necessário recobrir a superfície das amostras a observar com finas películas metálicas (habitualmente ouro, visto ser um metal altamente condutor).

Acoplada ao SEM encontra-se uma ferramenta de análise de EDS (Energy Dispersive X-ray analysis) segundo a qual é possível determinar a composição química elementar de uma área micrométrica da amostra.

II.1.2 Microscopia Electrónica de Transmissão(TEM)

Na microscopia electrónica de transmissão (TEM - Transmission Electron Microscopy) a imagem que se obtém é formada por um feixe estático de electrões que atravessa a amostra. Pela observação das imagens obtidas mediante a utilização desta técnica torna-se possível visualizar detalhes da microestrutura interna da espécie em questão. Os contrastes na imagem são produzidos por diferenças na dispersão dos feixes electrónicos ou por difracções produzidas entre vários elementos da microestrutura ou defeitos. Dada a forte absorção electrónica que os materiais sólidos exibem, torna-se necessário que o material a ser observado se encontre bastante disperso, o suficiente para garantir a transmissão de uma fracção significativa do feixe incidente. O feixe transmitido é projectado numa tela fluorescente ou num filme fotográfico, para que a imagem possa ser visualizada obtendo-se, neste tipo de microscopia, ampliações na ordem do milhão [Callister, 2011].

II.1.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) é uma das principais técnicas de caracterização química, sendo bastante útil na identificação de grupos funcionais e, consequentemente, de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos no estado sólido, líquido ou gasoso, podendo ser utilizada para quantificar componentes de misturas desconhecidas. Da utilização desta técnica resultam espectros, característicos de cada composto, que permitem deduzir a composição da amostra em questão a partir das ligações presentes ou através da comparação do espectro obtido com um de referência.

Os espectros de FTIR são obtidos por absorção de radiação infravermelha. Esta absorção de radiação causa alterações no estado vibracional das ligações covalentes entre os átomos, ou moléculas, e, deste modo, quando a frequência da radiação incidente é próxima de uma frequência natural de vibração da rede, ocorre a absorção da energia e o aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre os átomos e grupos de átomos. Atendendo à mecânica quântica, estas frequências correspondem ao estado fundamental (estado de menor frequência) e a vários estados excitados (estados com frequências mais elevadas). Assim, a absorção da radiação ocorre apenas em determinadas regiões do espectro que dependem de factores como o tipo de ligações presentes, átomos envolvidos e o próprio modo de vibração. De um modo geral, os modos de vibração podem ser divididos em dois grandes tipos: estiramento (stretching), que envolve mudanças na distância de ligação e, consequentemente, na distância interatómica, e encurvamento (bending), que envolve mudanças no ângulo da ligação ou na posição relativa dos átomos na molécula.

A aquisição do espectro de FTIR pode ser feita no modo de transmissão, detectando a irradiância que atravessa a amostra, ou no modo de absorção, medindo a irradiância absorvida pela amostra. Efectuando um varrimento em frequência da radiação electromagnética, obtém-se um espectro de transmissão, ou absorção, que evidência as zonas de absorção dos grupos funcionais na forma de picos ascendentes, ou invertidos, respectivamente [Becker, 1997; Morrisson, 1997; Solomons, 2000].

II.1.4 Difracção de Raios-X (DRX)

Recorrendo à técnica de difracção de raios-X é possível obter-se informação sobre a microestrutura de um determinado material, neste caso em particular, identificar as fases cristalográficas presentes na hidroxiapatite [Smith, 1998]. Sabendo que, de acordo com a sua estrutura interna, os sólidos podem ser cristalinos (quando os seus iões/átomos/moléculas apresentam um arranjo periódico) ou amorfos (quando os iões/átomos/moléculas do material estão distribuídos neste de modo aleatório) e que esta caracterização não é identificável pela simples observação externa do composto recorre-se, para o efeito, à técnica de DRX.

O arranjo periódico dos iões/átomos/moléculas na rede cristalina causa interferências construtivas responsáveis pelo padrão de difracção característico que surge quando o sólido cristalino é irradiado por um feixe de raios-X [Cullity, 2001; Hammond, 2001].

Uma vez que os comprimentos de onda dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atómicos dos sólidos cristalinos, quando um feixe de raios-X colide com um sólido cristalino, podem produzir-se picos reforçados de radiação, de diversas intensidades. Em 1913, Bragg demonstrou a relação existente entre a distância que separa as camadas de átomos, o comprimento de onda da radiação X incidente e ângulo de difracção, ficando esta relação conhecida como Lei de Bragg

$$n\lambda = 2d \sin \theta,$$

onde n é um número inteiro positivo (habitualmente 1, difracção de primeira ordem), λ é o comprimento de onda do raio X, d a distância entre planos cristalográficos e θ o ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão.

Existindo uma relação apropriada entre o ângulo de incidência, θ , e a distância, d , entre os planos e o comprimento de onda, λ , dos raios-X incidentes, as reflexões reforçam-se umas às outras, dizendo-se que as reflexões estão em fase. Porém, se o ângulo θ não satisfaz a condição para que as diferentes reflexões estejam em fase, estas interferem umas com as outras e o feixe é fraco ou nulo. Os planos de difracção, assim como as suas respectivas distâncias interplanares, as densidades dos átomos ao

longo de cada plano cristalino e o padrão de difracção por ela gerado, são características específicas e únicas de cada substância cristalina [Cullity, 2001; Hammond, 2001].

II.2 Caracterização eléctrica e dieléctrica

II.2.1 Correntes de Carga Isotérmicas/ Correntes de Descarga Isotérmicas (ICC/IDC)

As correntes de carga isotérmicas (ICC – *Isothermal Charging Current*) e as correntes de descarga isotérmicas (IDC – *Isothermal Discharge Current*), assim como o método de TSDC (*Thermally Stimulated Discharge Current*) descrito na secção seguinte, permitem analisar a distribuição de carga, e dipolos, em materiais altamente isolantes. Um esquema simplificado deste método encontra-se representado na Figura II.1.

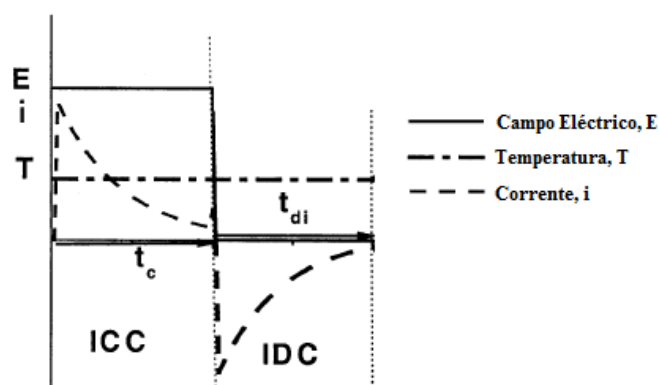


Figura II.1: Esquema representativo do procedimento efectuado para a obtenção de um espectro pelo método ICC/IDC [adaptado de Neagu, 2004].

Inicialmente, na fase que corresponde às medidas obtidas por ICC, uma determinada tensão DC é aplicada, a uma temperatura T definida, durante um período de tempo t_c , procedendo-se então à medição da corrente de carga. O tempo, t_c , é determinado de modo a que a polarização orientacional e da interface atinja um valor de saturação, tendo em atenção que para valores de t_c demasiado curtos apenas a superfície é carregada e que, aumentando este mesmo tempo, se consegue polarizar o interior da amostra e, deste modo, envolver mais espécies no processo de carga. Terminado este

período de tempo, t_c , a tensão previamente aplicada é removida e a corrente de descarga da amostra é medida durante um período de tempo t_{di} . Durante este processo espera-se que a polarização, devido ao alinhamento dos dipolos e à acumulação de carga nas interfaces, desapareça quase por completo de modo a que a corrente medida forneça informação sobre os efeitos da polarização. O tempo t_{di} tem de ser igual ou superior ao tempo t_c , uma vez que se o tempo t_{di} não é grande o suficiente, apenas as cargas menos estáveis são removidas, isto é, apenas as armadilhas (*traps*) que se encontram menos profundas são “descarregadas”. Aumentando o tempo t_{di} conseguem remover-se as cargas armadilhadas mais profundamente. A forma do gráfico obtido pela combinação das técnicas ICC e IDC, bem como os valores da carga total medidos durante estes processos, fornecem informações sobre os mecanismos de carga e descarga e os processos de armadilha/libertação de carga [Neagu, 2004; Gun’ko, 2007; Saidi-Amroun, 2009].

II.2.2 Corrente de Descarga Termicamente Estimulada (TSDC)

O método de TSDC (*Thermally Stimulated Discharge Current*) tem sido utilizado como uma poderosa ferramenta em numerosas investigações de carga espacial, observada pelo aquecimento de vários materiais (em diferentes meios) sob um amplo intervalo de temperaturas (15-600K), após a polarização por um campo electrostático (intensidade $E_p \approx 10^1 - 10^4$ kV/m), numa temperatura de polarização definida (T_p) [Bucci, 1964; Hitmi, 1988]. Os fenómenos observados ocorrem devido à sensibilidade da orientação molecular, fragmentos ou dipolos ligados, e cargas livres (prótons, iões e electrões) ao campo electromagnético ou electrostático externo. Isto é, a orientação de um sistema de dipolos e distribuição de cargas é caracterizada por determinadas “memórias” estruturais e espaciais específicas para o material estudado. Características dessa memória estão relacionadas com a dependência do tempo/temperatura de relaxação dos dipolos (cargas ligadas que causam relaxação dipolar), carga espacial e cargas livres (iões, prótons e electrões que fornecem relaxações de corrente directa (DC) assim como relaxação da carga relacionada com o mecanismo de Maxwell-Wagner-Sillars (MWS) associado à polarização na interface) [Gun’ko, 2007].

Diferentes tipos de materiais podem ser estudados por TSDC (sólidos, polímeros, filmes, pós, líquidos, suspensões, entre outros) sem qualquer preparação prévia, uma vez que estão disponíveis eléctrodos adaptados a qualquer morfologia. Esta ampla aplicação do método de TSDC sugere o seu interesse no estudo de objectos complexos, como por exemplo bio e nanomateriais, nanocompósitos, etc. [Gun’ko, 2007].

O método de TSDC utiliza uma frequência equivalente baixa (10^{-4} Hz), o que lhe permite uma boa resolução e sensibilidade, conseguindo medir correntes muito pequenas (na ordem de 10^{-15} A). Na base da utilização desta técnica assenta o facto de todos os materiais serem susceptíveis a polarização, uma vez que a nuvem electrónica dos átomos e moléculas sente a aplicação de campos electromagnéticos ou electrostáticos externos, bem como campos produzidos por átomos ou moléculas vizinhas. Se um campo é forte o suficiente e é aplicado por um período de tempo suficientemente grande, a estrutura da rede de moléculas pode diferir significativamente da estrutura observada sem a acção do campo. Se o sistema é congelado com o campo a baixa temperatura (por exemplo inferior a 100K), então a rede de dipolos pode diferir da mesma observada para a amostra sem a aplicação do campo. Por outras palavras, a polarização é congelada pelo arrefecimento da amostra até uma temperatura T_0 suficientemente baixa, prevenindo a despolarização do sistema por energia térmica. Este processo é válido para sistemas com energia de activação, como orientações de dipolos e cargas espaciais. Se, posteriormente, o sistema é aquecido a uma determinada taxa, β , então os dipolos individuais, aglomerados dos mesmos e estruturas contínuas descongelam, despolarizando a uma temperatura característica. Mudanças na mobilidade das diferentes espécies do sistema podem ser registadas pela corrente de descarga, causada principalmente pela rotação dipolar de relaxamento, até ao surgimento da relaxação DC causada pelos iões e electrões móveis e pela libertação de cargas presas em armadilhas (resultante da aplicação do campo eléctrico) [Gun'ko, 2007]. Uma vez que os processos de relaxação são sensíveis a características químicas e estruturais, para cada mecanismo de polarização, um pico inerente de corrente pode ser medido. A partir da posição do pico na escala da temperatura, bem como do seu tamanho e forma, esta técnica permite aceder a parâmetros dinâmicos e termodinâmicos (entre os quais energia de activação da relaxação, E_a , e tempo de relaxação, τ) [Feki, 2000].

II.2.2.1 Descrição da técnica TSDC

Como mencionado anteriormente, a técnica de TSDC utiliza a mobilidade molecular como sonda de medição, sendo particularmente adequada para materiais com carácter polar (como é o caso da água adsorvida e absorvida, materiais orgânicos polares (polímeros polares e macromoléculas existentes no organismo), células e tecidos [Gun'ko, 2007]. Esta técnica, apresentada na Figura , consiste na polarização uniforme da amostra pela aplicação de um campo eléctrico, E_p , a uma temperatura constante, T_p , durante um período de tempo, t_p , suficientemente grande para permitir que as diferentes unidades móveis do material se orientem sob a acção do campo eléctrico DC. A

configuração de polarização é então congelada devido a uma queda rápida na temperatura, para uma temperatura T_0 baixa o suficiente, de modo a que a mobilidade molecular possa ser considerada nula. À temperatura T_0 o campo é desligado e a amostra é curto-circuitada durante um período de tempo t_0 , para que se possa eliminar a carga espacial de rápida relaxação e estabilizar a amostra a esta temperatura. Por último, durante um aumento linear da temperatura, o retorno ao equilíbrio das entidades previamente orientadas gera uma corrente de despolarização, I_d , que é registada, em função da temperatura, com um electrómetro de elevada sensibilidade [Kalogeras, 2002].

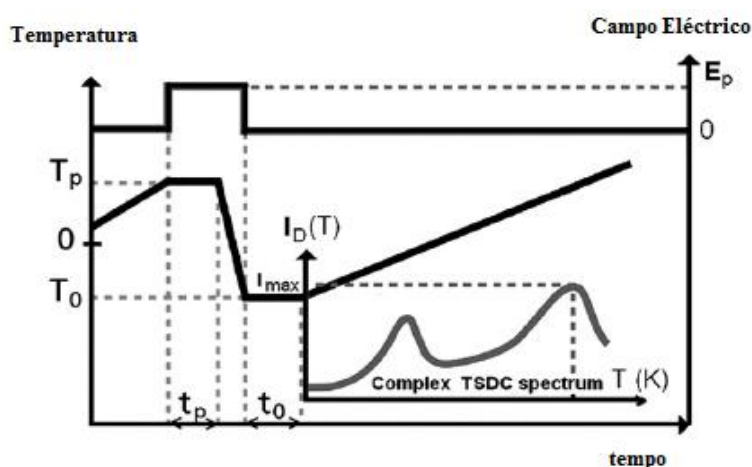


Figura II.2: Esquema representativo do procedimento efectuado para a aquisição de um espectro por TSDC [adaptado de Gun'ko, 2007].

II.2.3 Espectroscopia de Relaxação Dieléctrica (DRS)

A espectroscopia de relaxação dieléctrica (DRS – *Dielectric Relaxation Spectroscopy*) permite observar a interacção de uma amostra com um campo eléctrico, $E(t)$, dependente do tempo. A polarização resultante da aplicação do campo eléctrico AC, expressa tanto pela permitividade, $\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega)$, e condutividade, $\sigma^*(\omega) = \sigma'(\omega) + i\sigma''(\omega)$, em função da frequência, ou por um espectro de impedância (Z), caracteriza as flutuações de densidade de carga que acontecem na amostra em amplitude e no tempo (através do tempo de relaxação, que varia de alguns picossegundos, em líquidos de baixa densidade, a algumas horas, em vidros). Estas flutuações surgem, geralmente, da reorientação de momentos dipolares permanentes de moléculas individuais ou de rotações dipolares de moléculas flexíveis (como por exemplo polímeros). Outros possíveis

mecanismos incluem o transporte de iões ou o aparecimento de cargas na interface de sistemas heterogéneos. Os processos dinâmicos descritos são passíveis de observação por espectroscopia dieléctrica numa gama de frequências compreendida entre $10^{-6} - 10^{15}$ Hz, como representado na Figura II.3, no entanto, para conseguir fazer tais medições numa gama tão alargada, diferentes princípios têm de ser combinados apesar de, frequentemente, se adaptar a gama de frequências às características específicas da amostra. Esta técnica apresenta uma grande contribuição na caracterização eléctrica (nomeadamente nas propriedades dieléctricas) de materiais não condutores ou semi-condutores e distingue-se das outras técnicas espectroscópicas, como por exemplo a técnica de RMN, por ser especialmente sensível a interações intermoleculares [Kremer, 2002].

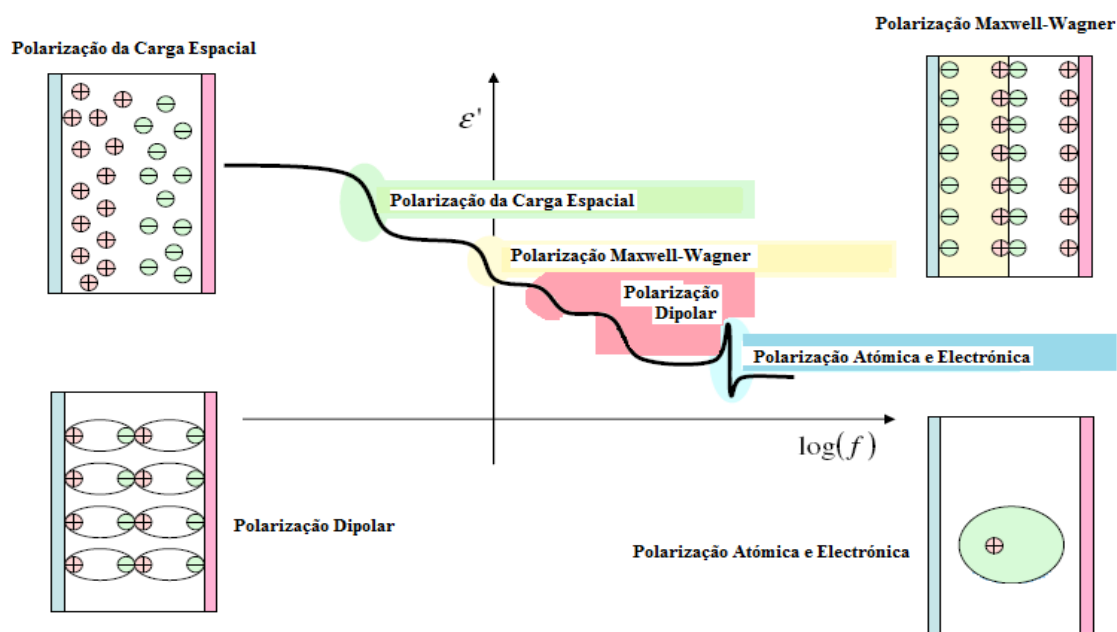


Figura II.3: Processos dinâmicos passíveis de ser observados por DRS num espectro de ϵ' em função de f [adaptado de Dias, 2009].

II.3 Ensaios de Bioactividade

De modo a determinar a concentração de cálcio e fósforo presente na solução de *PBS* antes e após imersão das amostras de HAp nos tempos pré-definidos recorreu-se à técnica de ICP-AES. O recurso a esta técnica permitiu estimar a precipitação de cristais de fosfato de cálcio na superfície das amostras de HAp polarizadas e não polarizadas.

II.3.1 Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Induzido (ICP-AES)

A técnica de ICP-AES utiliza uma fonte de atomização a altas temperaturas (10000K) para determinar a concentração de elementos (nomeadamente cálcio e fósforo) em matrizes orgânicas e inorgânicas. Quando uma substância é excitada, os elementos presentes emitem fotões com um comprimento de onda específico para cada um desses elementos. A luz emitida é dispersa por um monocromador e as linhas espectrais produzidas são recolhidas por tubos fotomultiplicadores conectados directamente a um sistema de processamento de dados controlado pelo computador [<http://www.requimte.pt/index.php?section=151>].

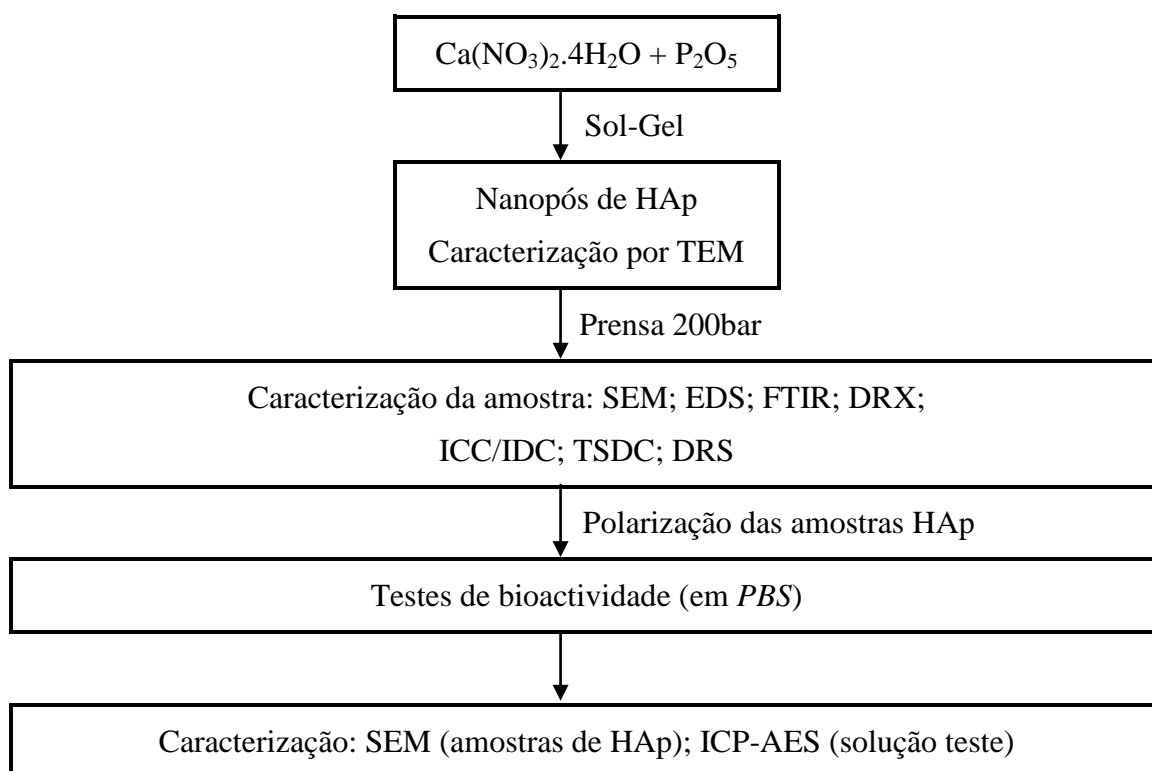
CAPÍTULO III

Procedimiento Experimental

CAPÍTULO III – Procedimento Experimental

III. 1 Esquema Resumo do Procedimento Experimental

O estudo da “Influência da Polarização Eléctrica no Crescimento de Hidroxiapatite para Implantes Ósseos” respeitou a orientação descrita no esquema apresentado, encontrando-se uma descrição mais pormenorizada no decorrer deste capítulo (Capítulo III). Iniciou-se o projecto com a produção de nanopós de hidroxiapatite pelo método sol-gel, utilizando como precursores o nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e o pentóxido de fósforo (P_2O_5). Seguidamente, prensaram-se 0.100g destes mesmos pós, a frio, resultando em amostras (pastilhas) em forma de discos de 13mm de diâmetro e 0.5mm de espessura. As pastilhas obtidas foram caracterizadas morfológica e estruturalmente, tendo-se analisado também as suas propriedades eléctricas e dieléctricas. Tendo em atenção os parâmetros de optimização das condições de polarização, diferentes amostras foram polarizadas, sob as mesmas condições, realizando-se testes de bioactividade, em *PBS*, em amostras polarizadas e de controlo durante 6h, 12h, 18h, 24h, 2 dias, 3 dias, 7 dias e 14 dias. Terminados os testes de bioactividade, as amostras de controlo e amostras polarizadas foram caracterizadas por SEM e as respectivas soluções de imersão por ICP-AES.



III.2 Preparação das amostras de HAp

III.2.1 Método Sol-Gel: obtenção dos nanopós de HAp

III.2.1.1 Reagentes

No método sol-gel utilizado usaram-se os precursores de fósforo e cálcio numa razão molar de

$\frac{Ca}{P} = 1.67$ e como solvente o etanol. Abaixo encontram-se as marcas e purezas dos reagentes:

-Etanol absoluto, CH_3CH_2OH , Panreac, pureza=p.a. 99,5%;

-Nitrato de cálcio tetrahidratado: $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, Panreac, pureza=p.a. $99,0\% \leq ASC \leq 103,0\%$;

-Pentóxido de fósforo: P_2O_5 , Sigma-Aldrich, pureza=p.a. $ASC \geq 98\%$.

III.2.1.2 Técnica Experimental

Com o intuito de se produzirem nanopós de HAp de elevada pureza, numa razão molar $Ca/P=1.67$, preparou-se a solução precursora de fósforo pela dissolução de 3,55g de pentóxido de fósforo num volume parcial de 50ml de etanol (esta etapa do procedimento foi efectuada na hotte, dada a libertação de vapores tóxicos provenientes da reacção do etanol, não anidro, com o pentóxido de fósforo), colocando-se a solução preparada sob agitação até à sua completa dissolução. Seguidamente preparou-se a solução precursora de cálcio dissolvendo-se 19,73g de nitrato de cálcio tetrahidratado num volume parcial de 50ml de etanol, colocando-se também esta solução sob agitação até à sua total dissolução. Uma vez completamente dissolvidas, misturaram-se as duas soluções preparadas e aguardaram-se 10 minutos. Findos estes 10 minutos de espera colocou-se a mistura (sol) num banho de glicerina a uma temperatura de $100^\circ C$ durante, aproximadamente, 1h20min, até se verificar a formação de um gel. O gel formado foi colocado numa estufa, a $80^\circ C$, durante um período de 24h, de modo a que o solvente ainda presente no gel evaporasse por completo. Retiraram-se os pós da estufa e sinterizaram-se. A sinterização respeitou um ciclo de aquecimento que teve início à temperatura ambiente, com uma taxa de aquecimento de $5^\circ C/min$, até a temperatura no interior do forno atingir os $600^\circ C$, permanecendo a amostra neste patamar, durante 30 minutos, antes de se iniciar o ciclo de arrefecimento.

III.2.2 Produção das pastilhas de HAp

Os pós de HAp obtidos, após sinterização a 600°C, foram esmagados, com o auxílio de um almofariz e um pilão, e prensados de modo a formar pastilhas de características semelhantes. Para tal pesaram-se, aproximadamente, 0.100g de pó de HAp, os quais foram colocados num molde SPECAC de 13mm de diâmetro. As pastilhas foram feitas na prensa existente no laboratório de materiais electroactivos do Departamento de Ciência dos Materiais, a frio, sendo os pós submetidos a 200bar (relativamente à pressão atmosférica), durante 30 minutos, resultando em pastilhas de , aproximadamente, 0.5mm de espessura e 25% de porosidade média.

III.3 Caracterização das Amostras de HAp

III.3.1 Caracterização Morfológica e Estrutural

III.3.1.1 SEM

No presente trabalho, o recurso à técnica de SEM permitiu visualizar a estrutura externa dos pós e das pastilhas de HAp produzidas, utilizando para tal um Microscópio Electrónico de Varrimento Zeiss, modelo DSM 962, existente no CENIMAT/I3N.

III.3.1.2 TEM

Com o intuito de determinar o tamanho médio dos pós obtidos pela técnica sol-gel recorreu-se à microscopia electrónica de transmissão. De modo a obter-se uma observação o mais individualizada possível dos grãos de HAp preparou-se uma solução de 1% (p/V) de HAp em etanol absoluto que posteriormente se dispersou com ultrassons. Esta técnica foi realizada no Instituto Superior Técnico (IST) de Lisboa, recorrendo-se a um aparelho *TEM Hitachi H-8100*, acoplado a um detector EDS , *ThermNoran*, para elementos leves. A tensão de aceleração aplicada para observação dos grãos foi de 200kV e a aquisição das imagens teve por base uma câmara CCD MegaView 1k X 1k.

III.3.1.3 FTIR

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho, FTIR, foi utilizada para a identificação dos grupos funcionais presentes nos pós de hidroxiapatite (tanto nos nanopós sintetizados pelo método sol-gel, como nos pós micrométricos - $1\mu\text{m}$ - comercializados pelo laboratório *Biotál*). Para tal recorreu-se ao espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR existente no CENIMAT/I3N. As amostras foram preparadas adicionando 1mg de pó de HAp a 200mg de KBr, prensando estes pós com o auxílio de um molde SPECAC de 13mm de diâmetro. O intervalo espectral varrido nestas mesmas pastilhas foi de 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} e o gráfico construído reflecte a transmitância em função do número de onda.

III.3.1.4 DRX

As amostras foram caracterizadas por Difracção de raios-X num difractómetro Phillips com raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre sob um potencial de aceleração de 30kV e um feixe de corrente de 15mA. Os ângulos de varrimento, $20^\circ < 2\theta < 60^\circ$, foram definidos tendo em atenção a posição dos picos de maior intensidade da HAp. No presente trabalho, o recurso a esta técnica teve como objectivo a identificação das fases cerâmicas presentes nos pós de HAp sintetizados, bem como a sua comparação com o pó de HAp comercial (*Biotál*). Os picos das diferentes amostras de HAp foram indexados com base nas fichas padrões JCPDS (#09-0432, #09-0169, #37-1497).

III.3.2 Caracterização Eléctrica

Para a caracterização eléctrica da amostra recorreu-se ao estudo de correntes termicamente estimuladas (ICC, IDC e TSDC) e à técnica de DRS.

III.3.2.1 ICC/IDC

Para o estudo das correntes de carga e descarga isotérmicas colocou-se uma pastilha de HAp entre dois eléctrodos de cobre no interior de uma câmara com um porta amostra. Esta câmara possuía uma resistência de aquecimento e um controlador de temperatura que permitiram controlar e estabilizar a temperatura a que se pretendia polarizar a amostra, assim como um electrómetro (para medir correntes eléctricas muito baixas) e uma fonte de alimentação para aplicar tensão (campo eléctrico DC). O electrómetro encontrava-se ligado a uma placa de aquisição que, por sua vez, se

encontrava ligada a um computador que comunicava com o controlador. As correntes de carga e descarga foram medidas em atmosfera de ar, em função do tempo, com um electrómetro KEITHLEY 617. De modo a que se pudessem obter resultados comparativos, algumas alterações às condições de elaboração do estudo foram efectuadas, entre as quais a temperatura de polarização, a intensidade do campo eléctrico DC aplicado, o tempo de polarização, o tamanho de grão e o número de dias que as amostras permaneceram na estufa antes de serem submetidas ao ensaio.

III.3.2.2 TSDC

Como descrito no sub-capítulo introdutório a esta técnica, o método das correntes termoestimuladas é utilizado para identificar e medir as características dos dipolos eléctricos, e armadilhas, para a carga espacial. Neste processo a amostra sofre uma variação de temperatura (aquecimento ou arrefecimento) enquanto a corrente é medida, surgindo picos de correntes, devidos aos dipolos, a determinadas temperaturas, no caso da amostra em questão ser polar. Existindo carga espacial surgirão também picos, normalmente mais largos, podendo aparecer picos originados pela contribuição de vários picos individuais com temperaturas máximas próximas.

Para a análise das correntes de descarga termicamente estimuladas, a polarização das pastilhas de HAp foi conseguida colocando a amostra numa câmara, susceptível à utilização de diferentes gases, com um porta amostras que possuía uma resistência de aquecimento que permitiu controlar a temperatura e a sua variação (juntamente com o controlador de temperatura), um electrómetro e uma fonte de alimentação. O electrómetro encontrava-se ligado a uma placa de aquisição ligada a um computador e o controlador ligado ao computador, permitindo assim controlar o aumento (ou diminuição) da temperatura (a uma taxa constante, β , de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$), registando, simultaneamente, a temperatura e a corrente. Mais especificamente, a amostra de HAp foi colocada entre dois eléctrodos de cobre, sendo submetida a um campo eléctrico de intensidade conhecida, E_p , a uma temperatura definida, T_p , durante um período de tempo, t_p . Terminado este procedimento, a amostra foi arrefecida até à temperatura ambiente, mantendo-se o mesmo campo eléctrico aplicado. Uma vez atingida a temperatura ambiente, removeu-se o campo eléctrico, determinando-se o grau de polarização da amostra por estudos de TSDC. Com o intuito de medir este grau de polarização reaqueceu-se a amostra polarizada, com uma taxa de aquecimento $\beta=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até 250°C , de modo a despolarizá-la, medindo a corrente de despolarização em função da temperatura com um electrómetro KEITHLEY 617. Também no estudo destas correntes, à semelhança do estudo das correntes isotérmicas, diferentes campos eléctricos DC, períodos de polarização e temperaturas

de polarização foram utilizados, assim como diferentes atmosferas, de modo a obter estudos comparativos mais coerentes e reprodutíveis.

III.3.2.3 DRS

A realização da técnica de DRS teve lugar com e sem a utilização de vácuo, utilizando-se dois diferentes aparelhos de medida. As medidas de relaxação dieléctrica (DRS) realizadas em atmosfera de ar tiveram lugar no Departamento de Química da FCT-UNL, mediante a utilização de uma ponte de medida de impedâncias NovoControl GmbH Alpha-N, um controlador de temperatura NovoControl-GmbH Quatro e um criostato BDS-1100 com exactidão de 0.1K. A gama de frequências varrida nestas medidas dieléctricas foi de 10^0 - 10^6 Hz, num intervalo de temperaturas de 223.15K – 473.15K. Por sua vez, as medidas de DRS efectuadas em vácuo (5μbar) foram realizadas no CENIMAT/I3N recorrendo-se, para tal, a uma ponte de medida de impedâncias Agilent 428A, que permitiu fazer medições entre 20Hz e 1MHz, e um controlador de temperatura LakeShore acoplado a um criostato Janis VPF-700 que possibilitou realizar medições desde a temperatura ambiente até aos 523.15K.

III.3.3 Ensaios de Bioactividade

Os ensaios de bioactividade foram realizados em pastilhas de HAp não polarizadas (amostras de controlo) e pastilhas polarizadas. Tendo em atenção a optimização das condições de polarização obtida por TSDC, a polarização das amostras de HAp foi efectuada a 200°C, durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico DC de 20kV/cm de intensidade, tendo estas mesmas amostras sofrido um aquecimento prévio de 1h, a 200°C, de modo a retirar a água adsorvida. Colocaram-se as pastilhas, polarizadas e não polarizadas, numa estufa, a 37°C, imersas em 10 ml de *PBS (Phosphate Buffer Solution)*, em poços de cultura celular. A permanência das amostras em *PBS* foi de 6h, 12h, 18h, 24h, 2 dias, 3 dias, 7 dias e 14 dias. Decorrido o período pré-estabelecido as amostras foram retiradas da solução e secas numa estufa, a 70°C, durante 24h. Uma vez secas, observaram-se as superfícies das amostras por SEM, utilizando-se a técnica de ICP-AES para determinar a concentração de cálcio e fósforo nas soluções de imersão.

III.3.3.1 Produção da solução PBS (*Phosphate Buffer Solution*)

III.3.3.1.1 Reagentes

A produção da solução utilizada para os ensaios de bioactividade, *PBS*, foi preparada utilizando-se os reagentes que se apresentam de seguida, com as respectivas marcas e purezas:

- Cloreto de Cálcio: CaCl_2 , Sigma-Aldrich, puro;
- Cloreto de Magnésio: Na_2HPO_4 , Scharlau, puro;
- Cloreto de Potássio: KCl , José M. Vaz Pereira, puro;
- Cloreto de Sódio: NaCl , Panreac, pureza=p.a. 99,5%;
- di-Hidrogenofosfato de Potássio: KH_2PO_4 , Carl Roth GmbH, pureza=p.a. 99%;
- Hidrogenofosfato de di-Sódio: Na_2HPO_4 , Scharlau, puro.

III.3.3.1.2 Procedimento Experimental

Para a preparação de 1L de PBS foram adicionadas 8.0063g de cloreto de sódio (NaCl), 0.1998g de cloreto de potássio (KCl), 0.9312g de hidrogenofosfato de di-sódio (Na_2HPO_4), 0.2000g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 0.1330g de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 0.1000g de cloreto de magnésio (MgCl_2) em água ultrapura até completar um volume final de solução de 1L. Terminada a dissolução dos sais na água, o valor de pH foi acertado com NaOH e KCl até que este mesmo valor estabilizasse em 7.4.

II.3.3.2 ICP-AES

A análise de ICP-AES foi realizada nas instalações do Departamento de Química da FCT-UNL, laboratório de Análises Químicas, Centro de Química Fina e Biotecnologia, com o intuito de determinar a concentração elementar de cálcio e fósforo presente nas soluções de PBS onde as amostras de hidroxiapatite estiveram imersas. Para a realização desta técnica recorreu-se a um espectrómetro de emissão atómica Horiba JOBIN-YVON, modelo ULTIMA, equipado com um gerador de frequência de 40.68MHz, e um monocromador Czerny-Turner.

CAPÍTULO IV

Resultados Experimentais

CAPÍTULO IV – Resultados Experimentais

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos, pelas diferentes técnicas de caracterização e ensaios de bioactividade, efectuados às amostras de HAp.

IV.1 Caracterização Morfológica e Estrutural

IV.1.1 SEM

A análise por microscopia electrónica de varrimento, SEM, foi realizada tanto aos pós de HAp produzidos pelo método sol-gel e sinterizados a 600°C, Figura IV.1, quanto às pastilhas produzidas pela prensagem dos mesmos a 200bar, Figura IV.2. A estas mesmas pastilhas foi ainda realizada análise de EDS, apresentando-se o espectro obtido na Figura IV.3.

Por observação da imagem de SEM obtida para os pós de HAp, Figura IV.1, é patente a existência de agregados micrométricos de partículas nanométricas, não sendo possível determinar o tamanho médio dos grãos. Por sua vez, pela análise da imagem de SEM obtida para a pastilha de HAp produzida pela prensagem de 0.100g de pó de HAp a 200bar, Figura IV.2, visualiza-se uma superfície bastante regular, apresentando áreas de algum relevo. Por último, analisando o espectro de EDS constata-se a presença dos elementos químicos que constituem a hidroxiapatite (oxigénio, fósforo e cálcio), sendo o pico de cálcio o que apresenta maior intensidade.

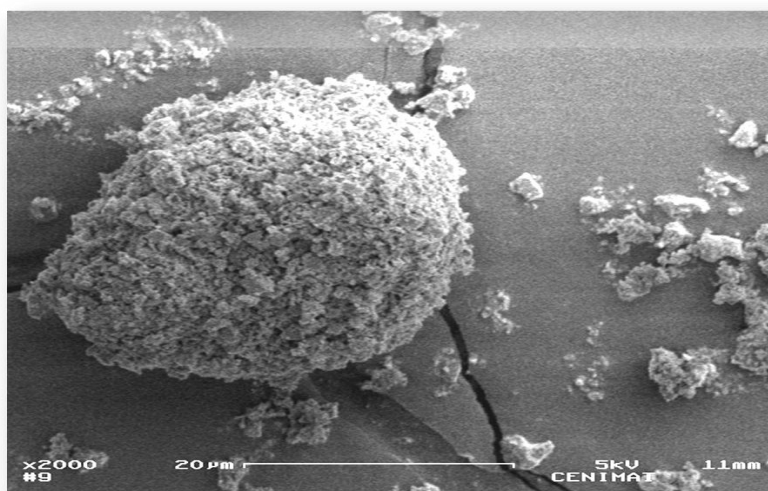


Figura IV.1: Imagem de SEM dos pós de HAp produzidos pelo método sol-gel e sinterizados a 600°C.

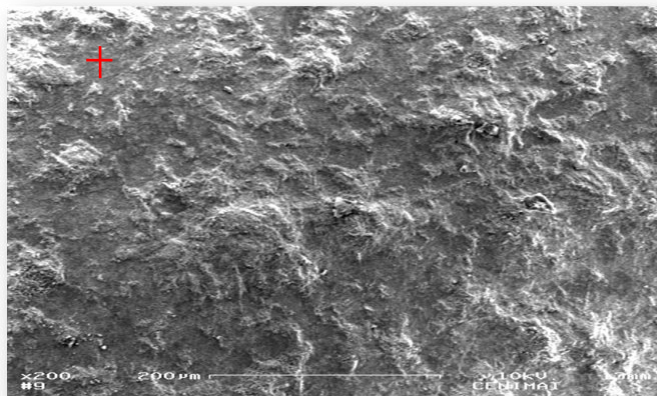


Figura IV.2: Imagem de SEM de uma pastilha de HAp produzida pela prensagem, a 200bar, de 0.100g de pó de HAp produzido pelo método sol-gel e sinterizado a 600°C.

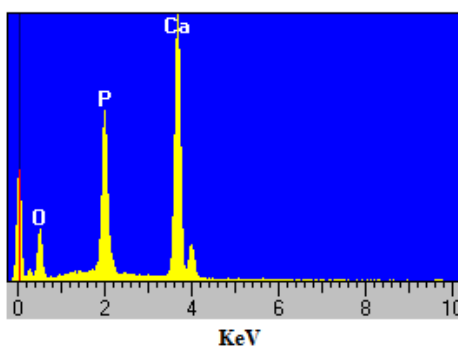


Figura IV.3: Espectro de EDS obtido para uma pastilha de HAp na zona assinalada na Figura IV.2.

IV.1.2 TEM

Mediante observação das imagens de TEM obtidas (uma das quais apresentada na Figura IV.4) foi possível, recorrendo ao software *ImageJ*, fazer um estudo estatístico do tamanho dos grãos de HAp produzidos. Para tal, de modo a obter uma estimativa da média dos diâmetros dos grãos, tomaram-se como referência as 5 amostras de maior, e menor, diâmetro. Deste estudo podemos concluir que pelo método sol-gel utilizado se conseguem obter grãos de HAp de diâmetro médio inferior a 100nm, observando-se ainda pequenos agregados de diâmetros que não excedem os 400nm. Estes resultados encontram-se concordantes com as publicações de Fathi et. al [Fathi, 2007], Feng et. al [Feng, 2005] e Rajabi-Zamani et. al [Rajabi-Zamani, 2008] para este método sol-gel.

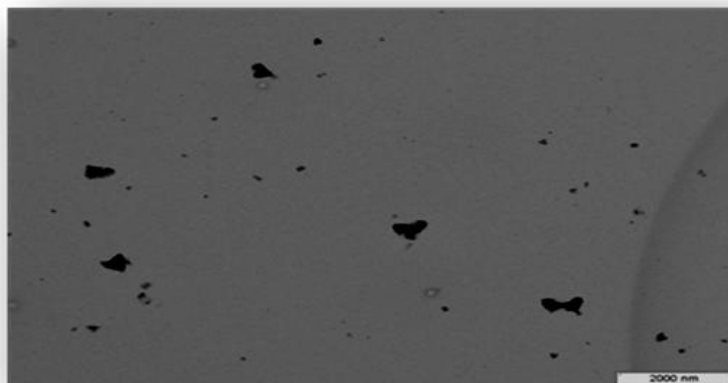


Figura IV.4: Imagem de TEM dos pós de HAp obtidos pelo método sol-gel.

IV.1.3 FTIR

Com o objectivo de verificar a presença dos grupos funcionais característicos da HAp procedeu-se à análise do espectro de infravermelho por transformada de Fourier obtido para os pós em estudo. O espectro obtido encontra-se representado na Figura IV.5 com a respectiva identificação dos modos de vibração FTIR característicos desta cerâmica. De um modo geral, podemos afirmar que os pós de HAp estudados pela técnica de FTIR, os pós sintetizados pelo método sol-gel e os pós comercializados pelo laboratório *Biotol*, se apresentam livres de impurezas, à excepção de água livre, apresentando todos os picos de transmitância característicos desta biocerâmica na sua forma estequiométrica.

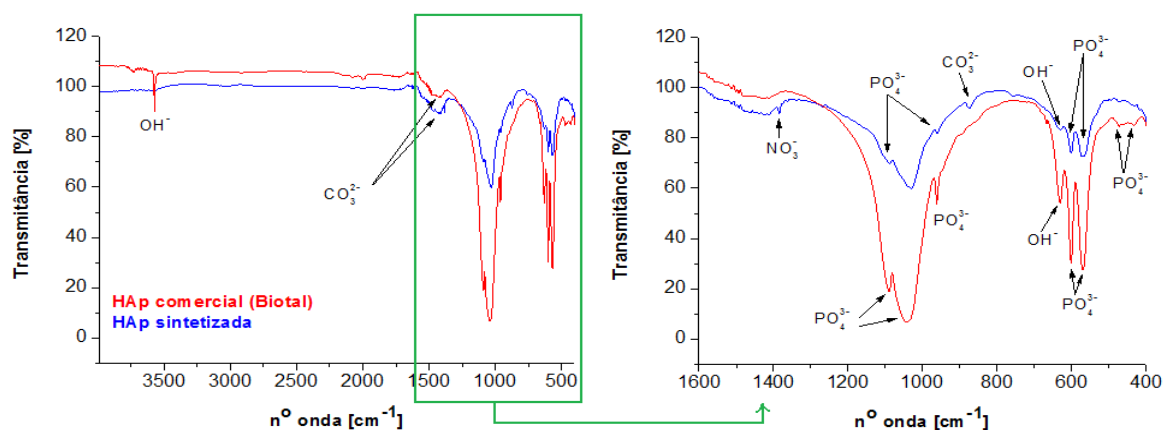


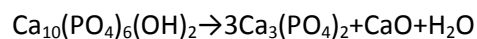
Figura IV.5: Espectro de FTIR obtido para os pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel e para os pós de HAp comercializados pelo laboratório *Biotol*.

Analisando o espectro de FTIR obtido para os dois pós, Figura IV.55, encontramos indicação sobre a formação de uma estrutura apatítica: uma banda larga centrada em números de onda da ordem dos 1000cm^{-1} e 1100cm^{-1} . As bandas atribuídas aos modos de stretching de grupos OH^- na hidroxiapatite são claramente observadas no espectro, uma por volta dos 630cm^{-1} , presente nas duas amostras, e outra em 3570cm^{-1} , observada apenas na amostra de HAp comercial. É também notória a presença de uma banda relacionada com a adsorção de água na rede cristalina, banda essa que surge por volta dos $3300\text{-}3800\text{cm}^{-1}$. Detectáveis são também os diferentes modos de vibração do grupo fosfato (PO_4^{3-}) presentes na amostra. As bandas com números de onda nas regiões de 1000cm^{-1} e 450cm^{-1} correspondem ao stretching simétrico dos iões PO_4^{3-} , surgindo na região entre os 960cm^{-1} e os 1100cm^{-1} o pico de vibração de maior intensidade deste grupo. Por sua vez, as bandas centradas em números de onda de 560cm^{-1} e 600cm^{-1} correspondem ao stretching assimétrico do grupo PO_4^{3-} .

O espectro de FTIR da HAp fornece ainda informação sobre o tipo de substituição de carbonato (A, B ou AB) que ocorreu na sua estrutura. Um modo comum de determinação deste tipo de substituição consiste na determinação das posições das bandas de carbonato (CO_3^{2-}) observadas no espectro de FTIR. Enquanto que as substituições do tipo A correspondem à substituição de grupos OH^- por grupos de CO_3^{2-} , as substituições do tipo B são caracterizadas pela substituição de grupos PO_4^{3-} por grupos CO_3^{2-} . No espectro obtido, os modos de vibração do grupo CO_3^{2-} sugerem que estamos na presença de uma apatite do tipo B, uma vez que se encontram bandas de carbonato por volta de 870cm^{-1} e 1430cm^{-1} [Cengiz, 2008; Costescu, 2010; Bogdanoviciene, 2006; Fathi, 2009; Kim, 2005; Rajabi-Zamani, 2008; Salehi, 2010; Ślósarczyk, 2005; Weng, 1998; Weng, 1999].

IV.1.4 DRX

Na Figura IV.6 encontra-se o difractograma obtido para os pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel, sinterizados a 600°C , e para os pós comerciais utilizados como base de comparação nesta dissertação (micropós ($\approx 1\text{ }\mu\text{m}$) de HAp fabricados pelo laboratório *Biotol*). Da análise do difractograma constata-se que ambos os pós se apresentam cristalinos, uma vez que os picos evidenciados nos correspondentes ângulos de difracção se encontram definidos. Mediante observação das fichas JCPDS mencionadas anteriormente podemos aferir que não se encontram subprodutos nas amostras, nomeadamente CaO e β -TCP. De facto, estudos realizados por Feng et. al [Feng, 2005], em 2005, demonstraram que estas fases cristalinas surgem da decomposição da HAp para temperaturas de sinterização superiores a 800°C , sob a reacção:



[Costescu, 2010; Feng, 2005].

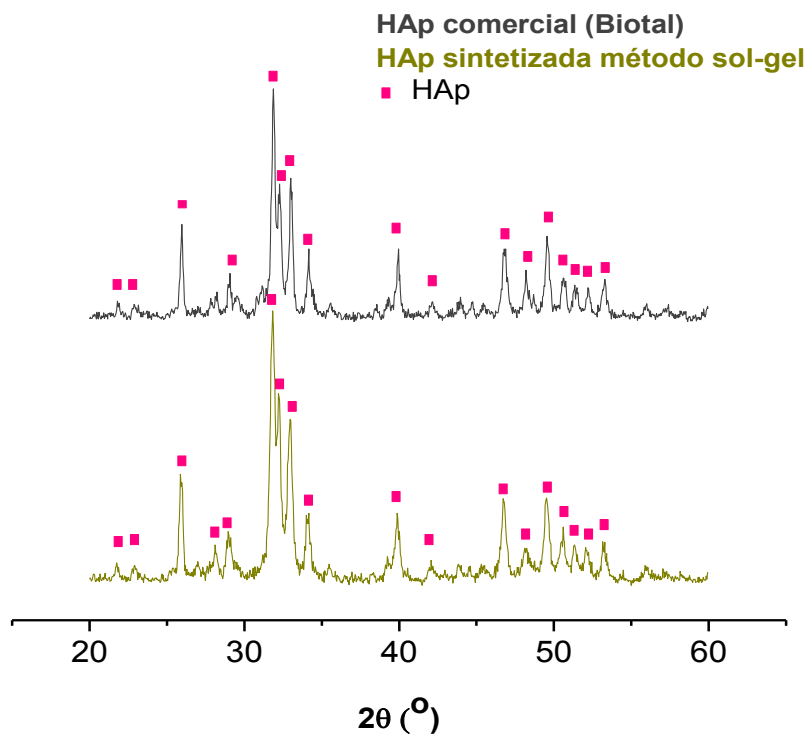


Figura IV.6: Difractograma obtido para os pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel (sinterizados a 600°C) e para os pós de HAp comercializados pelo laboratório *Biotol*.

Ainda pelo difractograma obtido foi possível determinar o tamanho dos cristalitos para os dois pós em estudo recorrendo-se, para tal, à fórmula de Scherrer:

$$t_c = \frac{0.89\lambda}{\beta \cos \theta},$$

onde t_c representa o tamanho do cristalito, λ o comprimento de onda dos raios-X ($\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1.5418 \times 10^{-10} \text{ m}$), β a largura a meia altura do pico de difracção de maior intensidade e θ o ângulo correspondente ao pico de maior intensidade. Neste contexto, determinou-se um tamanho de cristalito de aproximadamente $66 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ para a hidroxiapatite sintetizada pelo método sol-gel (valor concordante com a análise TEM efectuada) e um tamanho de cristalito de aproximadamente $811 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ para a hidroxiapatite comercializada pelo laboratório *Biotol*.

IV.2 Caracterização Eléctrica e Dieléctrica

IV.2.1 ICC/IDC

No estudo das correntes isotérmicas as amostras de HAp foram polarizadas, e despolarizadas, em atmosfera de ar, a diferentes temperaturas, com diferentes tempos de polarização e com campos eléctricos DC de diferente intensidade, de modo a inferir algumas conclusões acerca do comportamento eléctrico deste biomaterial.

Primeiramente, foram realizados dois ensaios, em dias consecutivos, a 120°C, a uma mesma pastilha de HAp, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm. Observando o gráfico da Figura IV.7 verifica-se que o ensaio realizado no dia 0# apresenta maior densidade de corrente, tanto para a carga como para a descarga da amostra. Esta diferença verifica-se nos vários ensaios de correntes isotérmicas realizados, possivelmente devido à existência de cargas/dipolos formados durante todo o processo de produção e prensagem do material, podendo também dever-se à incorporação de água atmosférica pela amostra durante todo o processo de preparação dos nanopós e pastilhas de HAp, nomeadamente durante o seu período de armazenamento. Esta água, devido à concretização do primeiro ensaio, evapora e, conseqüentemente, registam-se densidades de corrente inferiores nos ensaios posteriores. Neste contexto, no primeiro ensaio realizado, ensaio dia 0#, registaram-se valores de densidade de corrente, durante a carga, no intervalo de 0.8-1 μ A.cm⁻², variando a densidade de corrente, durante a descarga, entre, aproximadamente, 1nA.cm⁻² – 50pA.cm⁻². Para o ensaio realizado no dia 1#, devido a todas as razões apresentadas anteriormente, a densidade de corrente registada apresenta-se inferior, no entanto a diferença não é significativa.

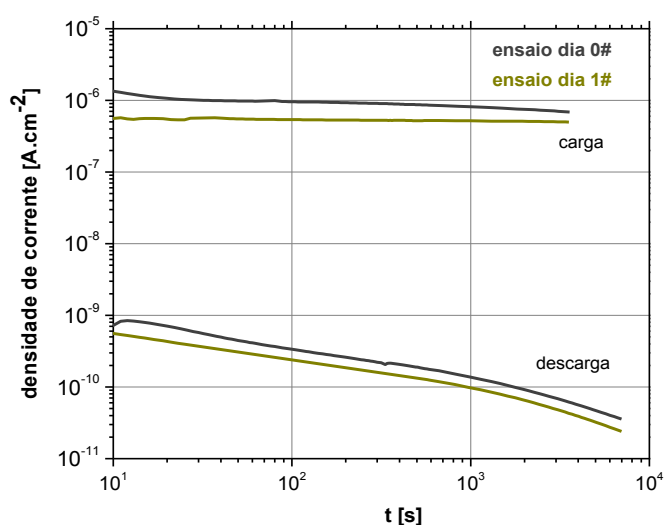


Figura IV.7: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 393.15K (120°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade.

Para verificar a hipótese da influência da água no cômputo das correntes isotérmicas, colocaram-se amostras de HAp durante 5 dias, Figura IV.8, e 22 dias, Figura IV.9, na estufa, a 353.15K (80°C), de modo a minimizar a presença de água nas amostras e, deste modo, estudar a influência do campo eléctrico na cerâmica.

Colocando as amostras na estufa, a 353.15K (80°C), é de esperar que alguma da água atmosférica absorvida pela amostra evapore e, como consequência, que as correntes registadas para as amostras nestas condições diminuam. De facto, analisando conjuntamente os gráficos da Figura IV.8 e da Figura IV.9 observa-se que, tanto para a amostra que permaneceu 22 dias na estufa como para a amostra que permaneceu na estufa apenas durante um período de tempo de 5 dias, se verificam correntes de carga inferiores, e mais estáveis, do que para as amostras de HAp armazenadas ao ar. Contudo, apesar da maior estabilidade da corrente de carga das amostras armazenadas na estufa, após um período de 1h (período de aplicação do campo eléctrico DC) a densidade de corrente de carga das duas amostras armazenadas sob as diferentes condições tende para o mesmo valor, valor esse que se encontra entre 200nA.cm^{-2} e 400nA.cm^{-2} . No que se refere às densidades de corrente de descarga, não se verificam diferenças significativas para ambas as amostras armazenadas sob as diferentes condições.

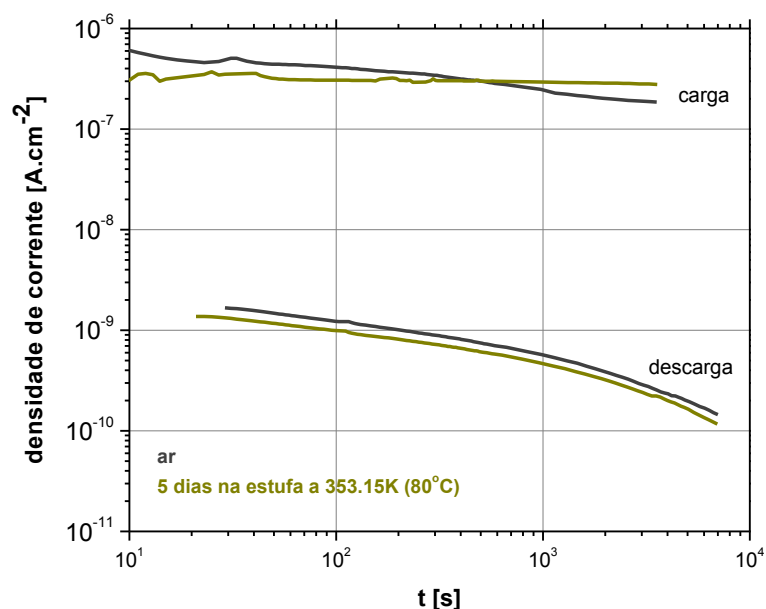


Figura IV.8: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade, antes e após a amostra ter permanecido 5 dias na estufa a 353.15K (80°C).

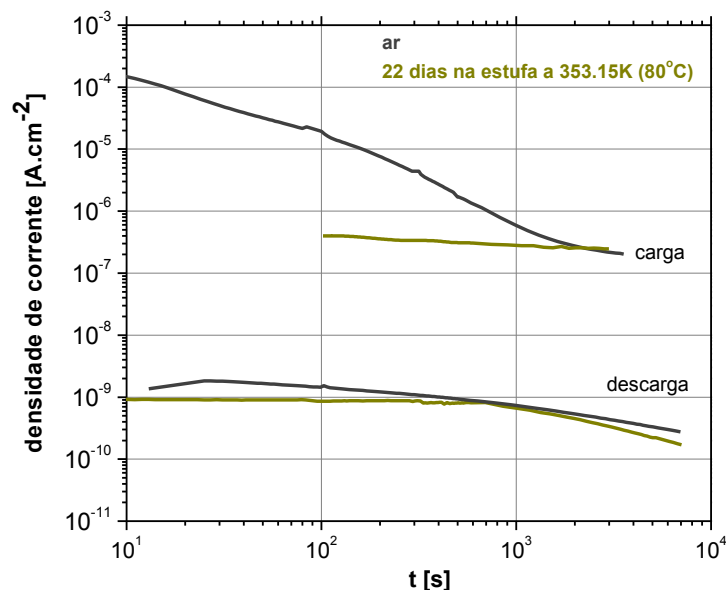


Figura IV.9: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1 kV/cm de intensidade, antes e após ter permanecido 22 dias na estufa a 353.15K (80°C).

Analisando o efeito da aplicação de diferentes campos eléctricos às amostras de HAp (Figura IV.10) verifica-se que, como esperado, quanto maior a intensidade do campo eléctrico maiores os valores de densidade de corrente, de carga e descarga, registados. Aplicando, a 353.15K (80°C), um campo eléctrico de 1kV/cm de intensidade a uma amostra de HAp de 0.5mm de espessura, obtêm-se densidades de corrente (de carga e descarga) superiores em mais de duas ordens de grandeza em relação às densidades de corrente registadas para a amostra sob a acção de um campo eléctrico DC de 140V/cm de intensidade. Apesar da fraca intensidade do campo eléctrico de 140V/cm, a amostra revelou-se susceptível à sua aplicação.

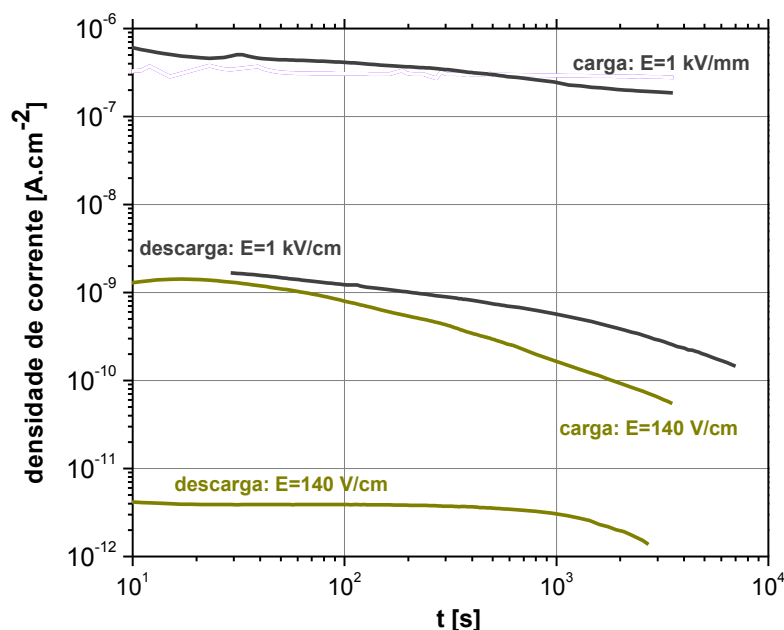


Figura IV.10: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 353.15K (80°C), para uma amostra de HAp sujeita à acção de dois campos eléctricos DC de intensidade distinta (1 kV/cm e 140V/cm).

Estudos de ICC/IDC semelhantes aos representados na Figura IV.7 foram realizados a uma amostra de HAp comercial (do laboratório *Biotol*) e, também, a uma amostra de HAp sintetizada pelo método sol-gel. Relativamente aos ensaios anteriormente realizados, representados na Figura IV.7, apenas foi alterada a temperatura a que decorreu o estudo, 300.15K (27°C), mantendo-se a intensidade do campo eléctrico DC aplicado, 1kV/cm, e o período de aplicação do mesmo (1h). A densidade de corrente registada para a amostra de HAp comercial sujeita a estas condições, assim como a densidade de corrente registada para a amostra sintetizada neste projecto pelo método sol-gel, encontram-se representadas na Figura IV.11. Relativamente a estas duas amostras podemos afirmar que para os pós de tamanho nanométrico (pós produzidos pelo método sol-gel) se registam densidades de corrente de carga mais elevadas que para a amostra com cristais de maiores dimensões (amostra do laboratório *Biotol*), no entanto a descarga nos nanopós acontece a uma taxa mais elevada.

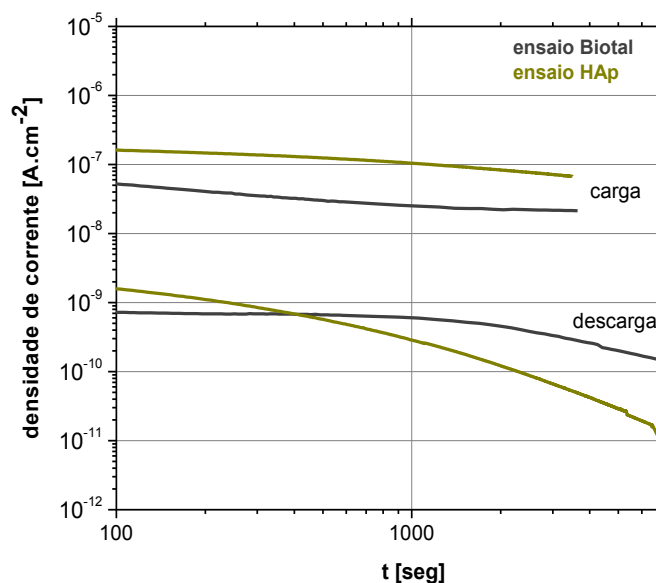


Figura IV.11: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 300.15K (27°C), para uma amostra de HAp comercial (*Biotol*) e uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. As amostras foram polarizadas sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm.

Ainda com as condições de polarização descritas para a Figura IV.11 realizou-se um ensaio numa amostra de HAp sintetizada pelo método sol-gel com um período de carga de 9 horas, tendo-se registado a descarga durante 28 horas. Analisando os dados da Figura IV.12 verifica-se que, mesmo após as 28 horas de descarga, a densidade de corrente de descarga permanece elevada, $0.3 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Verifica-se ainda que a densidade de corrente de carga na amostra diminui durante as 9 horas de aplicação do campo eléctrico DC de 1kV/cm, o que significa que um período de carga de 9h com um campo eléctrico DC desta intensidade, à temperatura de 300.15K (27°C), não é suficiente para que a corrente medida na amostra se deva exclusivamente à sua condutividade DC.

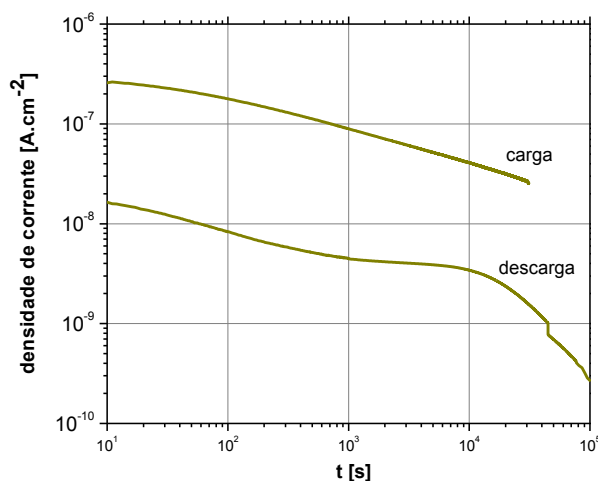


Figura IV.12: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 300.15K (27°C), para uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. A amostra foi polarizada sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm, durante um período de 9 horas.

Finalmente, estudos de correntes isotérmicas foram realizados à temperatura biológica, 310.15K (37°C). Analisando o espectro obtido, Figura IV.13, constata-se que utilizando um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm se obtêm densidades de corrente de carga entre 100-110nA.cm⁻².

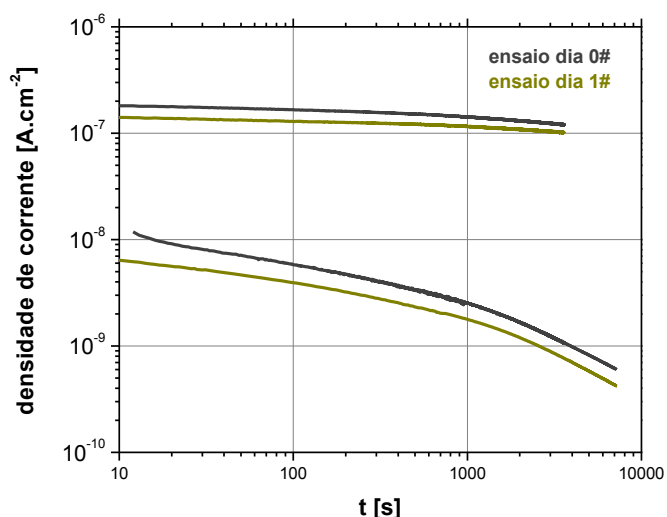


Figura IV.13: Espectro das correntes isotérmicas medidas, em atmosfera de ar, a 310.15K (37°C), para uma amostra de HAp produzida pelo método sol-gel no presente trabalho. A amostra foi polarizada, durante 1 hora, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm.

IV.1.2 TSDC

Com o desígnio de monitorizar a resposta do material em temperatura realizaram-se estudos de TSDC sem aplicação de campo eléctrico e com aplicação de campos eléctricos DC de diferentes intensidades, a diferentes temperaturas, durante diferentes períodos de tempo e com tempos de espera, t_0 , entre a remoção do campo eléctrico e a aquisição da corrente de despolarização distintos, apresentando-se de seguida os resultados mais significativos do estudo.

No primeiro ensaio de correntes termoestimuladas realizado, ensaio dia 0# da Figura IV.14, verifica-se a ocorrência de um pico por volta dos 373.15K (100°C), com valor máximo de densidade de corrente de, aproximadamente, 0.22nA.cm^{-2} . Uma vez que a amostra não sofreu qualquer tratamento térmico prévio, nem polarização, e que o ensaio se realizou em atmosfera de ar, pensa-se que tal pico poderá estar relacionado com a absorção de água atmosférica por parte da amostra. Por sua vez, no ensaio seguinte, ensaio do dia 1#, não se observa a ocorrência deste mesmo pico no espectro, provavelmente devido à evaporação da água previamente adsorvida pela amostra aquando da realização do primeiro ciclo de aquecimento. Devido à provável evaporação da água, espécie condutora, verificam-se densidades de corrente mais baixas no último ensaio, sendo apenas visível um aumento na densidade de corrente para temperaturas elevadas.

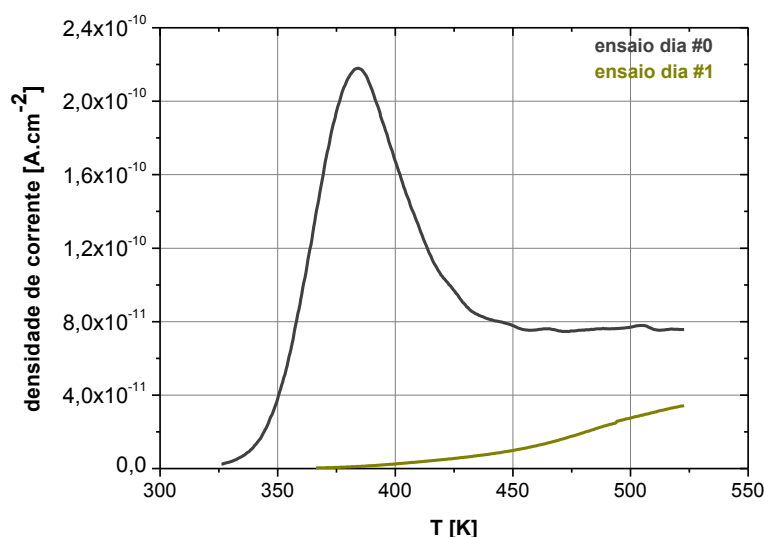


Figura IV.14: Espectro de TSDC obtido, em atmosfera de ar, para uma amostra de HAp não polarizada.

Para a construção do espectro representado na Figura IV.15 repetiu-se o processo que levou à obtenção do espectro da Figura IV.14, com excepção da atmosfera utilizada. Aqui, a amostra foi

aquecida desde a temperatura ambiente até uma temperatura máxima de 523.15K (250°C), em atmosfera de árgon. Como se constata da observação directa da Figura IV.15, para o ensaio efectuado no dia 0#, surge novamente um pico semelhante ao do ensaio realizado no dia 0# da Figura IV.14, embora com valores de densidade de corrente menores (aproximadamente $50\text{pA}\cdot\text{cm}^{-2}$). Apesar da realização dos dois ensaios da Figura IV.15 ter acontecido em atmosfera de árgon, este pico que figura por volta dos 373.15K (100°C), poderá dever-se a água incorporada pela amostra no decorrer do seu armazenamento. No segundo ensaio efectuado nestas condições verifica-se o aparecimento de um novo pico, deslocado para temperaturas mais baixas, aproximadamente 325.15K. Tendo como referência o estudo efectuado por Itoh, em 2006 [Itoh, 2006], este pico poderá evidenciar a existência de carbonato na amostra de HAp (perceptível no espectro de FTIR realizado – Figura IV.5).

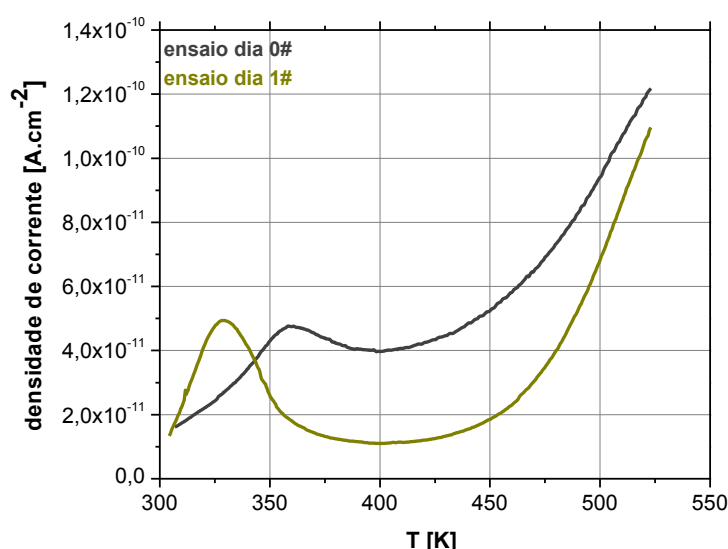


Figura IV.15: Espectro de TSDC obtido, em atmosfera de árgon, para uma amostra de HAp não polarizada.

Seguidamente polarizou-se uma amostra de HAp, a 323.15K (50°C), sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 1kV/cm, em diferentes atmosferas, durante 1h (Figura IV.16). Como resultado verifica-se que as densidades de corrente registadas em vácuo foram as menores, apresentando a amostra polarizada em atmosfera de árgon os valores de densidade de corrente de maior intensidade. Esta ocorrência encontra-se, possivelmente, relacionada pelo facto do ensaio em atmosfera de árgon ter sido o primeiro a ser efectivado, isto é, no ensaio realizado nesta atmosfera existia ainda uma grande quantidade de água incorporada pela amostra que, posteriormente ao

primeiro ciclo de aquecimento, evaporou, resultando em densidades de corrente menores no ensaio seguinte, em ar. No ensaio realizado em ar é novamente visível um pico a 313.15K possivelmente resultante da substituição de carbonato que ocorreu na amostra. Comparando as densidades de corrente obtidas para este ensaio com os valores de densidades de corrente obtidos para o aquecimento da amostra em ar, sem polarização, Figura IV.14, verifica-se que a amostra polarizada apresenta um valor de densidade de corrente no pico aproximadamente três vezes maior que o obtido para a amostra sem polarização.

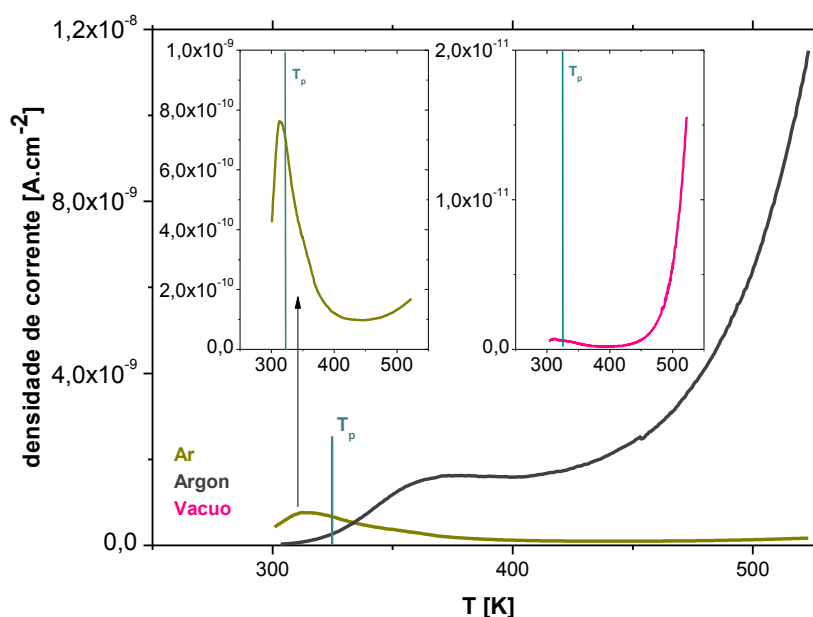


Figura IV.16: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAp polarizada a 50°C, durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico, E_p , de intensidade 1 kV/cm de intensidade, em vácuo e em atmosfera de ar e de árgon.

No estudo seguinte de correntes termoestimuladas realizaram-se quatro ensaios em dias distintos polarizando uma mesma amostra de HAp, a 323.15K (50°C), durante 1h, em atmosfera de árgon. Como resultado destas polarizações obtiveram-se os espectros representados na Figura IV.17. Novamente, para o primeiro ensaio efectuado à amostra sob estas condições, ensaio dia 0#, registaram-se os valores de densidade de corrente no pico mais elevados, aproximadamente 0.18 nA.cm^{-2} , provavelmente devido à existência de água nos poros da pastilha de HAp utilizada. No segundo ensaio efectuado, ensaio dia 7#, verificou-se também um pico acentuado, mais afastado da temperatura de polarização, com valor máximo de densidade de corrente próximo de 0.12 nA.cm^{-2} , possivelmente devido a alguma água que voltou a ser incorporada pela amostra no intervalo das

medições. Porém, no segundo ensaio efectuado no dia 7#, este mesmo pico desaparece (uma vez que a amostra não permaneceu tempo suficiente ao ar para conseguir voltar a incorporar água após o primeiro ciclo de aquecimento) surgindo correntes de menor densidade. Neste ensaio não obtivemos nenhum pico definido, apenas um patamar com densidade de corrente relativamente constante, 40 pA.cm^{-2} , entre 400-500K. Por sua vez, no último ensaio a que a amostra foi submetida a estas condições, ensaio dia 27#, voltaram a surgir densidades de corrente na ordem de 0.17 nA.cm^{-2} , semelhantes às obtidas para o ensaio do dia 0#, o que vem mais uma vez reforçar a tese de que os valores de densidade de corrente mais elevados se devem à presença de água nos poros da amostra.

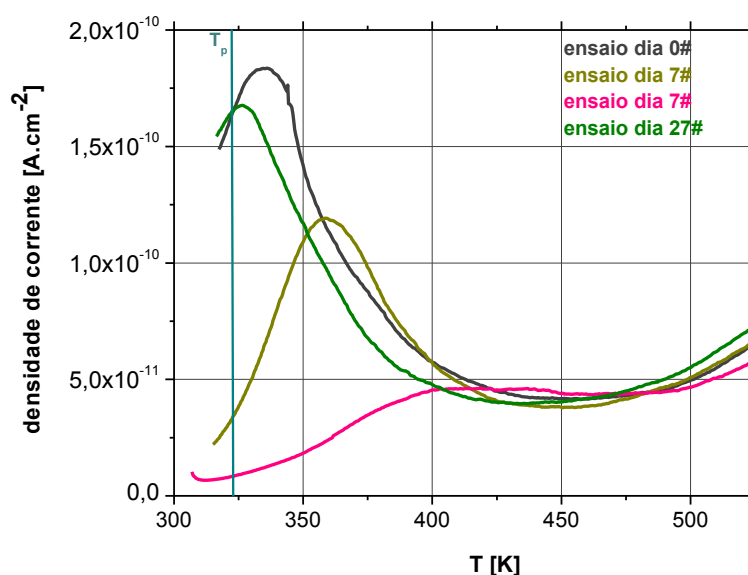


Figura IV.17: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAp polarizada a 323.15K (50°C), durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico, E_p , de intensidade $E_p = 1 \text{ kV/cm}$, em atmosfera de árgon.

De modo a tentar eliminar o efeito da incorporação de água pela HAp na aquisição das correntes termoestimuladas, procedeu-se ao aquecimento da amostra, a 473.15K (200°C), durante 1h, antes de se efectuar a polarização. Os resultados obtidos para os diferentes ensaios nas diferentes atmosferas, árgon e ar, encontram-se na Figura IV.18. Comparando os dois gráficos verifica-se que, mesmo submetendo a amostra a um aquecimento prévio de 200°C, durante 1h, as densidades de corrente registadas para os ensaios realizados em ar são bastante superiores, quando comparadas com as densidades de corrente registadas para a HAp submetida às mesmas condições de ensaio apenas com alteração da atmosfera. Em ambos os casos surgem picos próximos da temperatura de polarização que diminuem em intensidade com o aumento do tempo, t_0 , entre a remoção do campo eléctrico DC e o início da aquisição da corrente de despolarização.

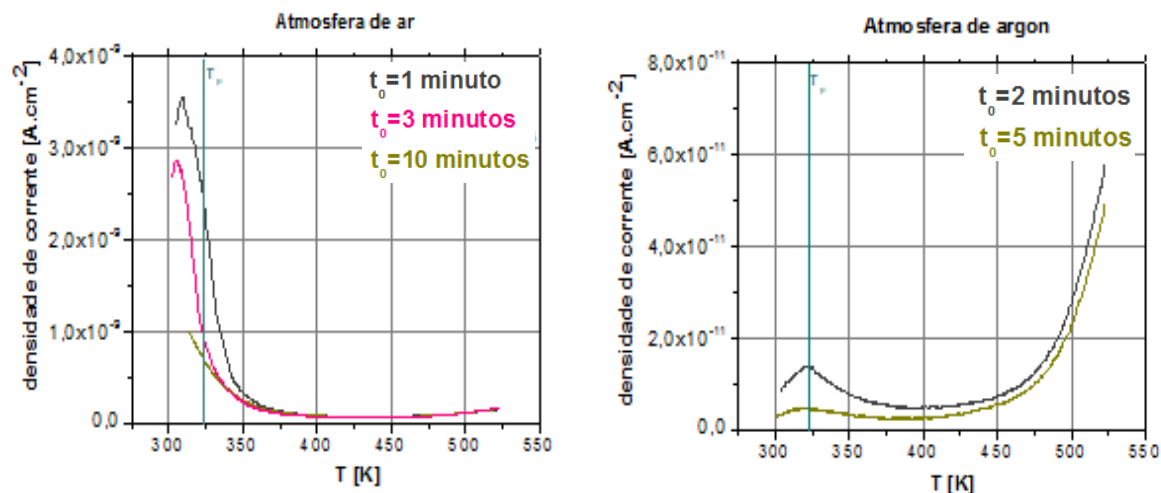


Figura IV.18: Espectros de TSDC obtidos uma amostra de HAp aquecida a 273.15K (200°C), durante 1h, e posteriormente polarizada a 323.15K (50°C), durante 1h, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade $E_p = 1$ kV/cm, em atmosfera de ar e de árgon, com controlo do tempo (t_0) decorrido entre a remoção do campo eléctrico DC e o início do TSDC.

Para a construção dos espectros representados na Figura IV.19 aqueceu-se a amostra de HAp a 200°C, em árgon, durante 1h, polarizando-se, posteriormente, a 120°C sob a acção de dois diferentes campos eléctricos DC, um de 1kV/cm e outro de 2kV/cm de intensidade. Analisando o gráfico apresentado verifica-se que apesar de se ter duplicado a intensidade do campo eléctrico aplicado à amostra do primeiro para o segundo ensaio do dia 0#, as correntes do segundo ensaio aparecem menores, mais uma vez possivelmente devido à evaporação de grande parte da água ligada à amostra no primeiro ciclo de aquecimento a que a amostra foi submetida. Por sua vez, no ensaio do dia 4#, ainda com um campo eléctrico de intensidade 2kV/cm, as densidades de corrente de descarga medidas foram as maiores. Provavelmente conseguiram excitar-se cargas/dipolos de maior energia de activação, atingindo a densidade de corrente um valor máximo de, aproximadamente, 60 pA.cm^{-2} . Esta maior corrente de descarga poderá também estar associada à reabsorção de água da atmosfera por parte da amostra no intervalo de tempo que decorreu entre as aquisições.

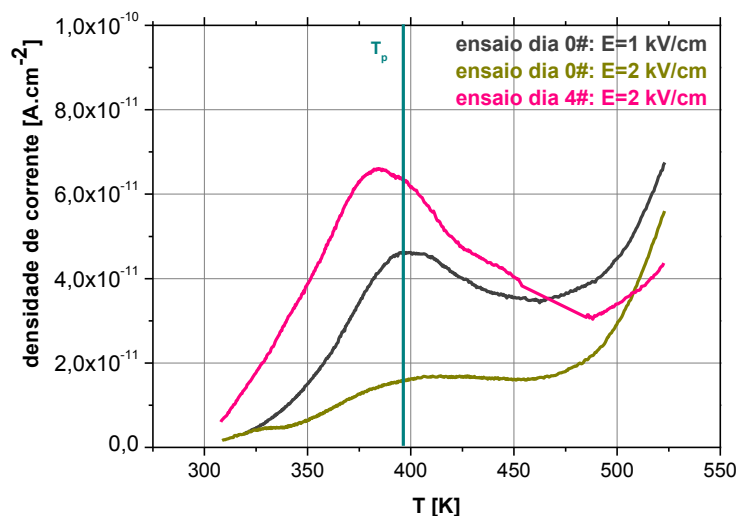


Figura IV.19: Espectros de TSDC obtidos para uma amostra de HAP polarizada a $393,15 \text{ K}$ (120°C), durante 1 h , sob a acção de um campo eléctrico DC de diferentes intensidades ($E_p = 1 \text{ kV/cm}$ e $E_p = 2 \text{ kV/cm}$), em atmosfera de árgon.

O efeito da aplicação de campos eléctricos de diferente intensidade para a polarização da HAP encontra-se representado na Figura. Nestes ensaios, o período de tempo, t_0 , que a amostra permaneceu em curto-circuito foi de 2 h tentando-se, deste modo, eliminar a contribuição da carga espacial de rápida relaxação. Observando esta mesma figura constata-se que os diferentes espectros de TSDC apresentam um pico próximo à temperatura de polarização, pico esse denominado como aparente por Neagu [Neagu, 2010]. Os picos aparentes apresentam a particularidade de alterar a sua posição no espectro com a alteração da temperatura de polarização, surgindo a uma temperatura $10\text{-}20^\circ \text{C}$ superior com relação à temperatura de polarização. Relativamente às curvas de despolarização associadas aos campos de polarização de intensidade 20 kV/cm e 5 kV/cm verificamos que o pico de maior intensidade se apresenta composto, resultante de dois distintos fenómenos de relaxação. Observando mais atentamente o espectro de TSDC da amostra polarizada com o campo eléctrico de 5 kV/cm , verificamos que de novo surge um pico a, aproximadamente, $313,15 \text{ K}$ (40°C), que possivelmente se deve à substituição de carbonato do tipo B que ocorreu na amostra. Verifica-se ainda que o máximo da densidade de corrente aumenta com o aumento de intensidade do campo eléctrico DC de polarização.

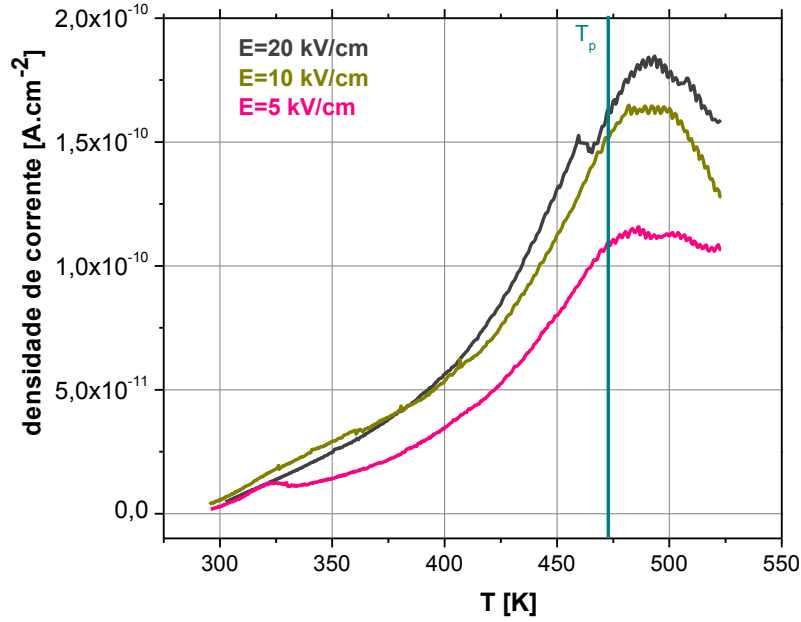


Figura IV.20: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada a esta mesma temperatura, durante 1h, em atmosfera de árgon, sob a acção de campos eléctricos DC de diferente intensidade (20kV/cm, 10kV/cm e 5kV/cm), com $t_0=2h$.

A partir do espectro de TSDC acima representado calculou-se a carga de polarização, Q_p , inerente aos diferentes processos de polarização (Tabela IV.1IV.1), utilizando-se para tal a equação

$$Q_p = \frac{1}{\beta} \int_{T_{inicial}}^{T_{final}} J(T) d(T) \quad (IV.1)$$

sendo $J(T)$ a densidade de corrente, medida à temperatura T , e β a taxa de aquecimento. Analisando a Tabela IV.1 verifica-se que com o aumento da intensidade do campo aplicado aumenta a carga de polarização, Q_p , e a densidade de corrente máxima, J_{max} .

Sabe-se que a polarização induzida por um campo eléctrico DC diminui após a remoção do mesmo, sendo a carga de polarização (P) descrita como função do tempo t pela expressão:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -\frac{P(t)}{\tau(T)} \xrightarrow{\beta=dT/dt} \frac{dP(T)}{dT} = -\frac{P(T)}{\beta\tau(T)} \quad (IV.2).$$

Deste modo, a carga de polarização residual à temperatura T pode ser expressa como:

$$P(T) = \frac{1}{\beta} \int_T^{\infty} J(T) d(T) \quad (IV.3).$$

Partindo das equações IV.2 e IV.3, e $J(T) = -\beta dP(T)/dT$, $\tau(T)$ pode ser representado por:

$$\tau(T) = \frac{1}{\beta J(T)} \int_T^{\infty} J(T) dT \quad (IV.4)$$

Assumindo que o tempo de relaxação, τ , pode ser descrito pela Lei de Arrhenius:

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{kT}\right) \quad (IV.5)$$

onde τ_0 é o factor pré-exponencial, E_a a energia de activação e k a constante de Boltzmann, combinando a equação IV.4 com a equação IV.5 resulta:

$$\frac{E_a}{kT} + \ln \tau_0 = \ln \left[\frac{1}{\beta} \int_T^{\infty} J(T) dT \right] - \ln J(T) \quad (IV.6).$$

Da equação IV.6 verifica-se que a energia de activação, E_a , pode ser obtida pelo declive da recta de regressão linear do gráfico obtido fazendo o termo do lado direito da equação IV.6 *versus* $1/T$ (Figura IV.21), sendo τ_0 calculado a partir da ordenada na origem desta mesma recta de regressão linear. A E_a , assim como τ_0 , calculados encontram-se representados na Tabela IV.1.

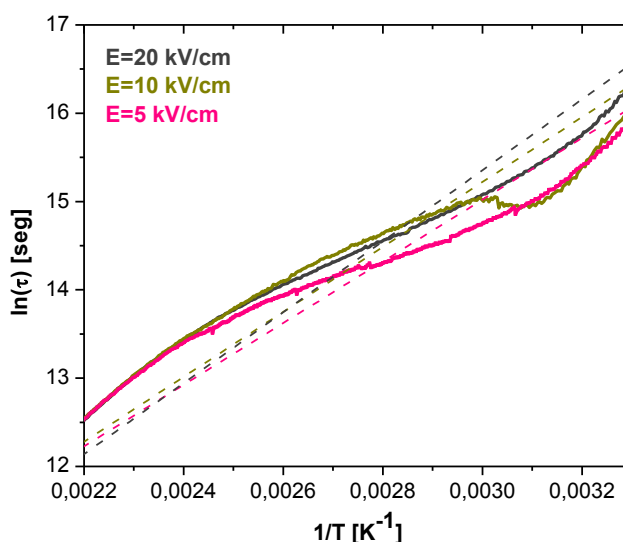


Figura IV.21: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas a 200°C sob a acção de campos eléctricos DC de intensidade 5kV/cm, 10kV/cm e 20kV/cm.

Tabela IV.1: Efeito das condições de polarização (campos eléctricos DC de diferente intensidade) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.

Polarização			Despolarização			
T_p [K]	E_p [kV.cm ⁻¹]	T_{pico} [K]	J_{max} [A.cm ⁻²]	Q_p [C.cm ⁻²]	E_a [eV]	τ_0 [seg]
473.15	5	483.15	1.15×10^{-10}	3.84×10^{-5}	0.32 ± 0.01	66 ± 1
473.15	10	492.15	1.65×10^{-10}	5.63×10^{-5}	0.30 ± 0.01	94 ± 1
473.15	20	493.15	1.85×10^{-10}	6.19×10^{-5}	0.35 ± 0.01	27 ± 1

Analisando a Tabela IV.1 verifica-se que as energias de activação obtidas para os três diferentes processos apresentam valores semelhantes, no entanto, para as amostras polarizadas sob a acção do campo eléctrico de 20kV/cm de intensidade obteve-se uma E_a ligeiramente mais elevada. Por sua vez, no que respeita ao factor pré-exponencial, τ_0 , é de notar que a amostra polarizada com o campo eléctrico de maior intensidade é a que apresenta um menor valor desta variável.

Utilizando o espectro de TSDC obtido para a amostra de HAp polarizada sob a acção do campo eléctrico DC de 20kV/cm (campo utilizado no presente trabalho para polarizar as amostras de HAp utilizadas nos ensaios de bioactividade) calculou-se o tempo de relaxação do cerâmico à temperatura biológica, 37°C. Recorrendo à lei de Arrhenius e partindo da E_a e do valor de τ_0 apresentados na Tabela IV.1, estimou-se em 7.05×10^6 seg o tempo de relaxação da amostra quando submetida a estas condições de polarização, o que significa que a HAp, uma vez implantada no corpo, se mantém polarizada durante um longo período de tempo, sendo esta uma vantagem para aplicações biomédicas.

Para analisar o efeito da aplicação do campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm na polarização da HAp a diferentes temperaturas procedeu-se de modo análogo ao descrito anteriormente, encontrando-se os resultados obtidos na Figura IV.22 e Figura IV.23. Nestes ensaios, o período de tempo que a amostra permaneceu em curto-circuito foi, como anteriormente, de 2h, para eliminar a contribuição da carga espacial de rápida relaxação. Analisando os espectros obtidos para estes ensaios verifica-se a ocorrência de um pico próximo à temperatura de polarização correspondente, apresentando ambos os espectros um outro pico por volta de 460K ($\approx 190^\circ\text{C}$). Utilizando os resultados apresentados na Tabela IV.2 para as duas diferentes condições de polarização da amostra de HAp, no

que respeita à densidade de corrente, carga de polarização e energia de activação do processo de polarização a 393.15K (120°C) verifica-se que estas três variáveis apresentam valores menores quando comparados com os obtidos para a polarização efectuada a 473.15K (200°C), apresentando-se o factor pré-exponencial, τ_0 , bastante superior.

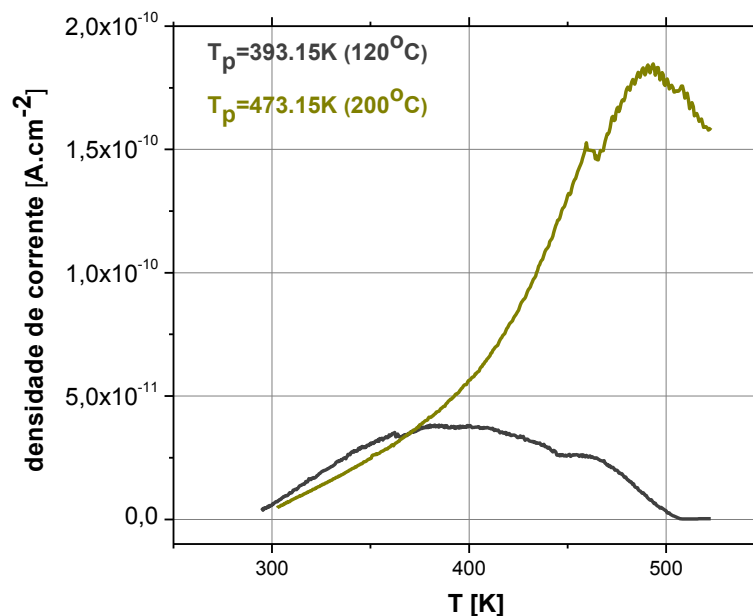


Figura IV.22: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada, durante 1h, a diferentes temperaturas, em atmosfera de árgon, sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm, com $t_0=2h$.

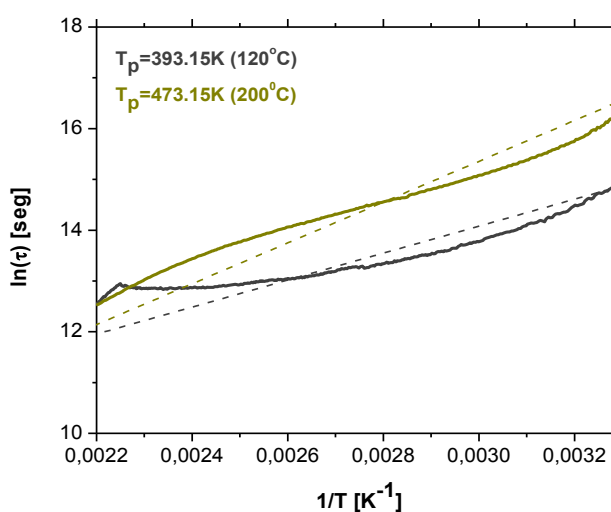


Figura IV.23: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas a diferentes temperaturas sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm.

Tabela IV.2: Efeito das condições de polarização (diferentes temperaturas de polarização) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.

Polarização			Despolarização			
T_p [K]	E_p [kV.cm ⁻¹]	T_{pico} [K]	J_{max} [A.cm ⁻²]	Q_p [C.cm ⁻²]	E_a [eV]	τ_0 [seg]
393.15	20	383.15	3.81×10^{-11}	2.43×10^{-5}	0.23 ± 0.01	454 ± 1
473.15	20	493.15	1.85×10^{-10}	6.19×10^{-5}	0.35 ± 0.01	27 ± 1

Por último realizaram-se ensaios de TSDC com diferentes tempos de polarização das amostras de HAp de modo a estudar a influência deste factor nas correntes de despolarização medidas. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras IV.24 e IV.25 encontrando-se os principais resultados sumariados na tabela IV.3.

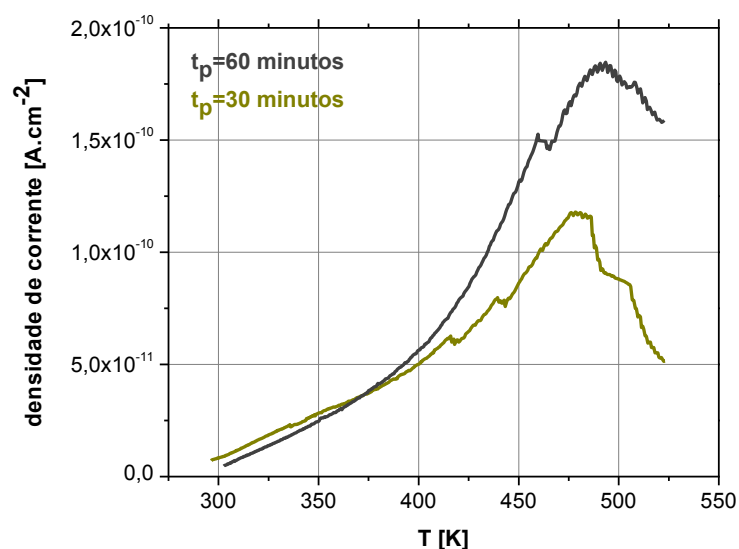


Figura IV.24: Espectro de TSDC obtido para uma amostra de HAp aquecida durante 1h, a 473.15K (200°C), e posteriormente polarizada a esta mesma temperatura, 473.15K (200°C), em atmosfera de árgon, com diferentes tempos de polarização ($t_p=30$ minutos e $t_p=60$ minutos), sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20kV/cm, com $t_0=2$ h.

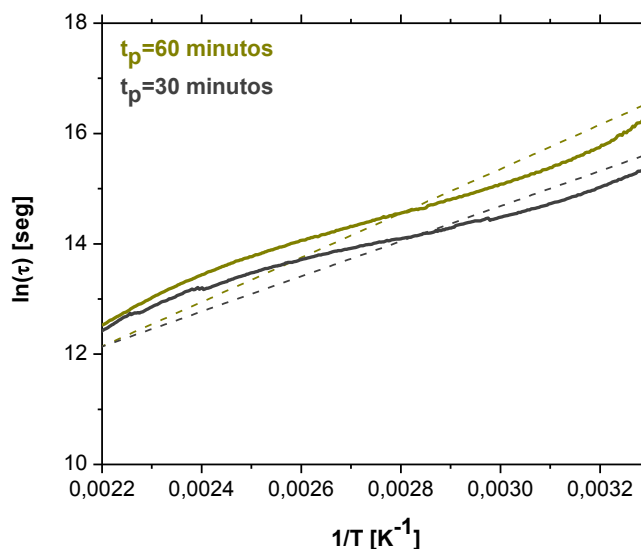


Figura IV.25: Determinação da energia de activação, E_a , e do factor pré-exponencial, τ_0 , para as amostras de HAp polarizadas durante diferentes períodos ($t_p=30$ minutos e $t_p=60$ minutos) sob a acção de um campo eléctrico DC de intensidade 20 kV/cm.

Tabela IV.3: Efeito das condições de polarização (diferentes tempos de polarização) nos parâmetros de despolarização obtidos pelos espectros de TSDC.

Polarização			Despolarização			
T_p [K]	E_p [kV.cm ⁻¹]	t_p [min]	J_{max} [A.cm ⁻²]	Q_p [C.cm ⁻²]	E_a [eV]	τ_0 [seg]
473.15	20	30	1.17×10^{-10}	4.47×10^{-5}	0.27 ± 0.01	169 ± 1
473.15	20	60	1.85×10^{-10}	6.19×10^{-5}	0.35 ± 0.01	27 ± 1

Analisando os resultados acima é possível aferir que um maior tempo de polarização se reflecte num valor de densidade de corrente máximo de maior intensidade e numa maior carga de polarização, Q_p . Conclui-se ainda que a alteração deste parâmetro influencia significativamente a energia de activação do processo em questão e o factor pré-exponencial τ_0 .

IV.1.3 DRS

Sabe-se que a resposta em frequência de um material, em termos da permissividade, respeita a expressão:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_{\infty} + \sum_i^n \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau_i} + \frac{\sigma_{DC}}{j\omega\varepsilon_0},$$

que se concretiza, em termos gráficos, numa resposta semelhante à apresentada na Figura IV.26.

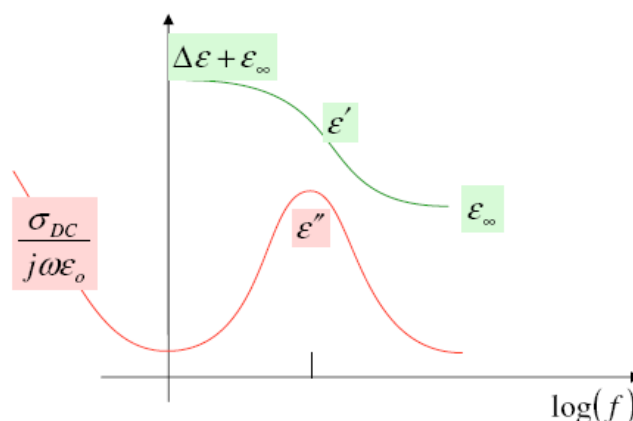
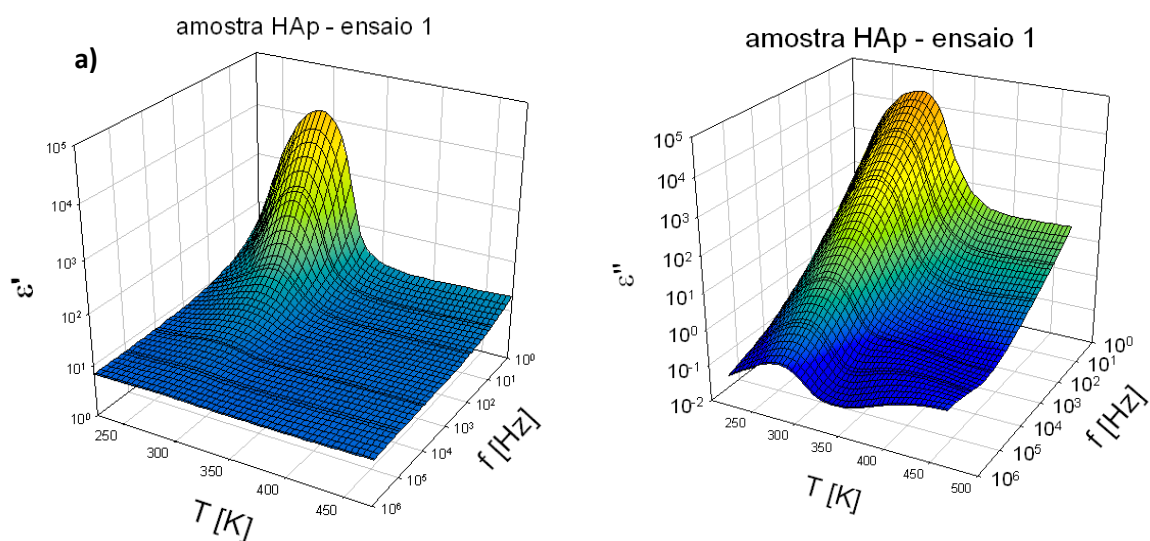


Figura IV.26: Resposta de um material em frequência [Dias, 2009].

Os diferentes ensaios de DRS realizados à HAp em atmosfera de ar encontram-se representados na Figura IV.27. Analisando o primeiro ensaio efectuado é clara a presença de um pico de grande intensidade por volta dos 293.15K (20°C), pico esse que corresponde a um composto volátil presente na amostra, uma vez que desaparece nos dois ensaios realizados posteriormente (ensaios 2 e 3 da mesma figura). Tal pico relaciona-se, possivelmente, com a presença de água livre incorporada pelo biocerâmico durante todo o processo de produção e armazenamento da amostra, uma vez que o pico aumenta em intensidade com a diminuição da frequência de aquisição [Banys, 2009]. Nos dois últimos ensaios realizados em atmosfera de ar, ensaios 2 e 3, é visível um único pico (que surge com menor intensidade no ensaio 3) que se desloca em frequência com o aumento da temperatura, levando à percepção da ocorrência de um mecanismo de polarização no material. Verifica-se ainda que, inerente aos três ensaios, subsiste um aumento de intensidade, na componente real e imaginária da permissividade, para temperaturas mais elevadas e para valores de frequência menores, tendendo a componente real da permissividade para, aproximadamente, 17, e a componente imaginária da permissividade para, aproximadamente, 10, nos três espectros de DRS obtidos. Pensa-

se que este aumento não se encontra relacionado com a condutividade DC da HAp, mas sim que evidencie um outro mecanismo de polarização ao qual o biocerâmico é susceptível, uma vez que o aumento se faz sentir tanto na parte real como na parte imaginária da permitividade.

Seguidamente realizou-se um ensaio de espectroscopia de relaxação dieléctrica em vácuo (Figura IV.28). Relativamente aos espectros obtidos para a componente real e imaginária da permitividade da amostra de HAp nestas condições constata-se semelhanças com os espectros apresentados nos ensaios 2 e 3 da Figura IV.27, apresentando as duas diferentes componentes da permitividade em vácuo, Figura IV.28, valores de menor intensidade (relativamente aos apresentados na Figura IV.27). No espectro da componente imaginária da permitividade, ϵ'' , continua evidente um pico associado a um mecanismo de polarização ao qual a HAp é susceptível (também visível nos ensaios 2 e 3 da Figura IV.27) que se desloca em frequência com o aumento da temperatura. De um modo geral, relativamente aos gráficos correspondentes aos ensaios 2 e 3 da Figura IV.27 e ao ensaio apresentado na Figura IV.28 observa-se que a permitividade da hidroxiapatite diminui com o aumento da frequência e aumenta com o aumento da temperatura (comportamento típico de um semi-condutor). Para o ensaio de DRS realizado em vácuo analisou-se ainda a condutividade AC da amostra (Figura IV.29). Os resultados obtidos para esta variável revelaram-se concordantes com os do estudo de Gittings et. al [Gittings, 2007]. No que respeita à componente real da condutividade, σ' , esta aumenta em intensidade com o aumento da frequência, apresentando valores próximos de $1 \times 10^{-3} \text{ S.m}^{-1}$ para valores de frequência de 1MHz. Por sua vez, analisando o espectro da componente imaginária da condutividade, σ'' , observa-se o seu valor máximo ($2 \times 10^{-5} \text{ S.m}^{-1}$) a 1MHz e 525K.



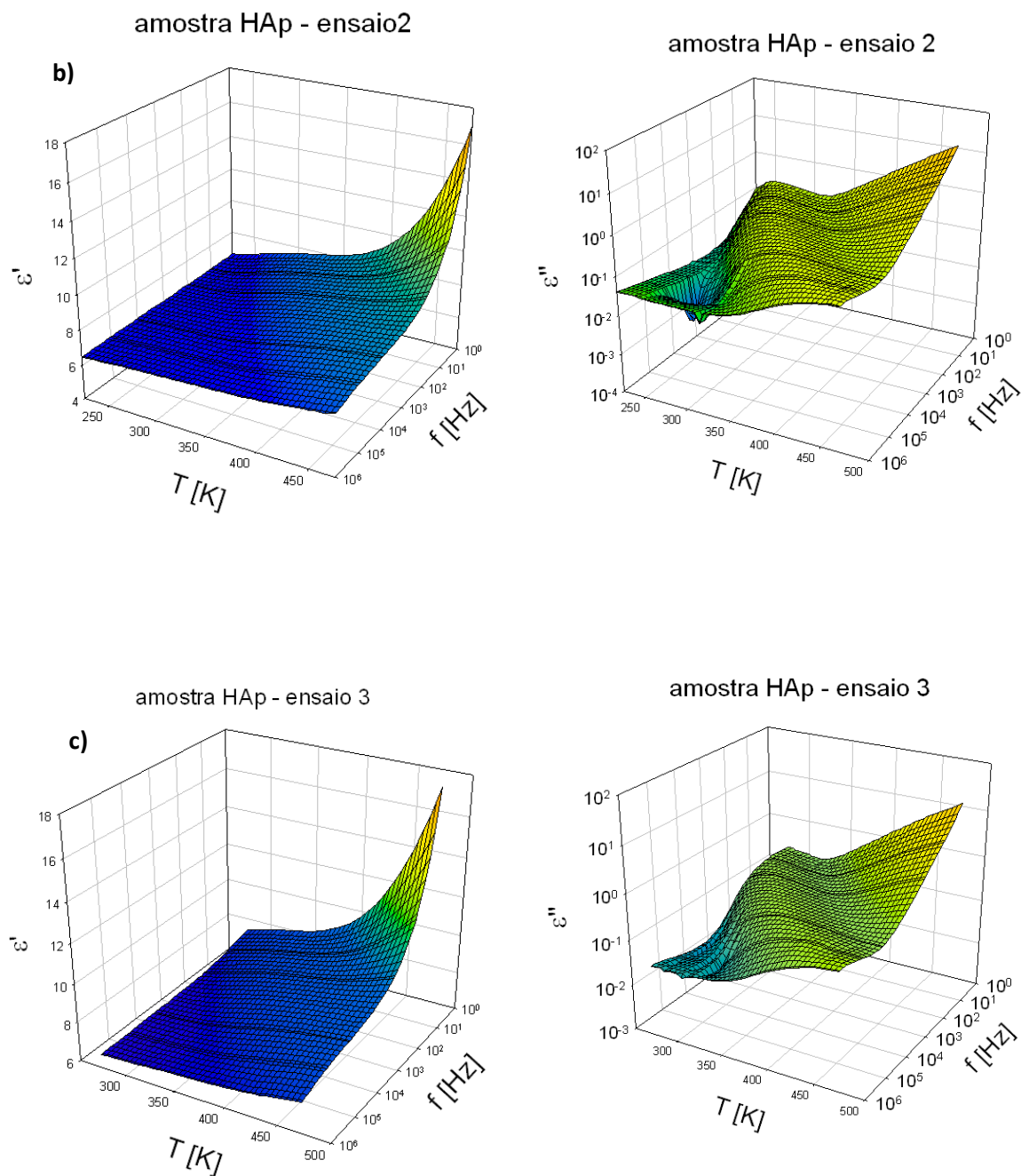


Figura IV.27: Espectros de DRS do ensaio 1 (a), ensaio 2 (b) e ensaio (3) relativos à componente real, ϵ' , e à componente imaginária, ϵ'' , da permitividade em função da frequência, f , e temperatura, T , obtidos, em atmosfera de ar, para uma amostra de HAp.

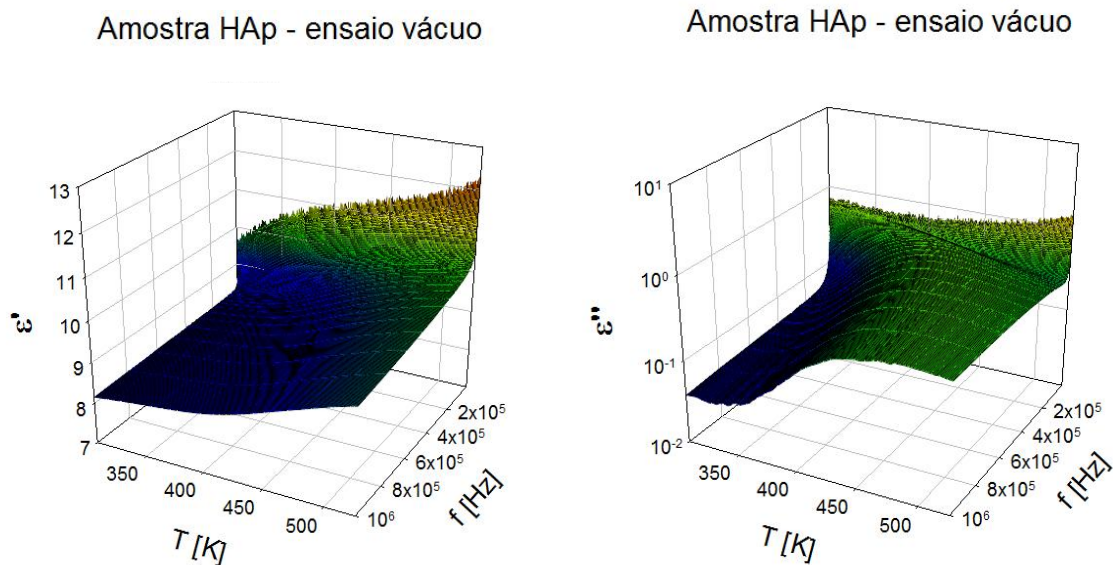


Figura IV.28: Espectros de DRS da componente real, ϵ' , e da componente imaginária, ϵ'' , da permissividade em função da frequência, f , e temperatura, T , obtidos, em vácuo, para uma amostra de HAp.

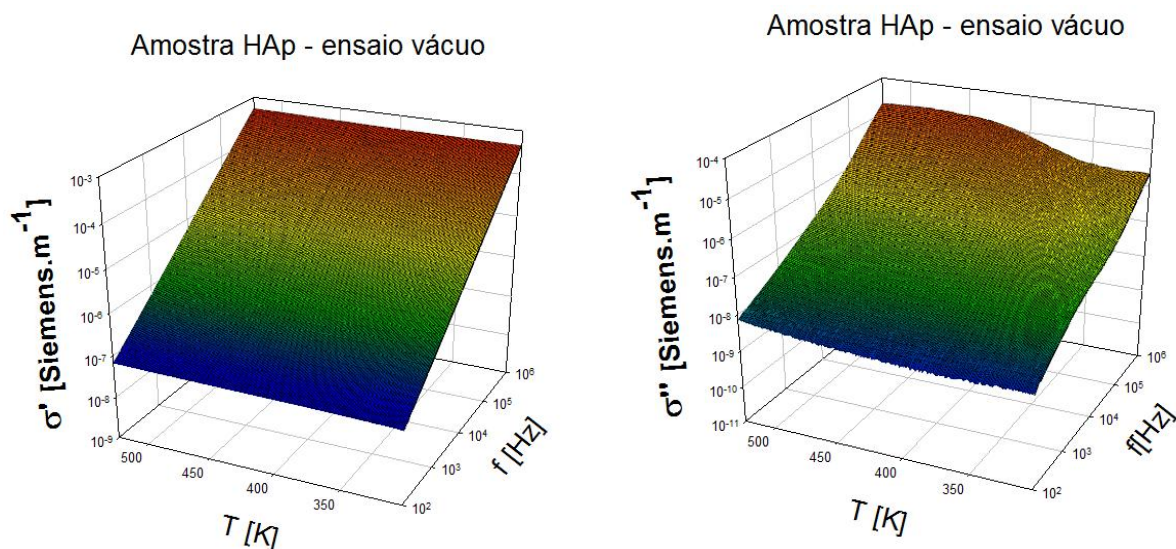
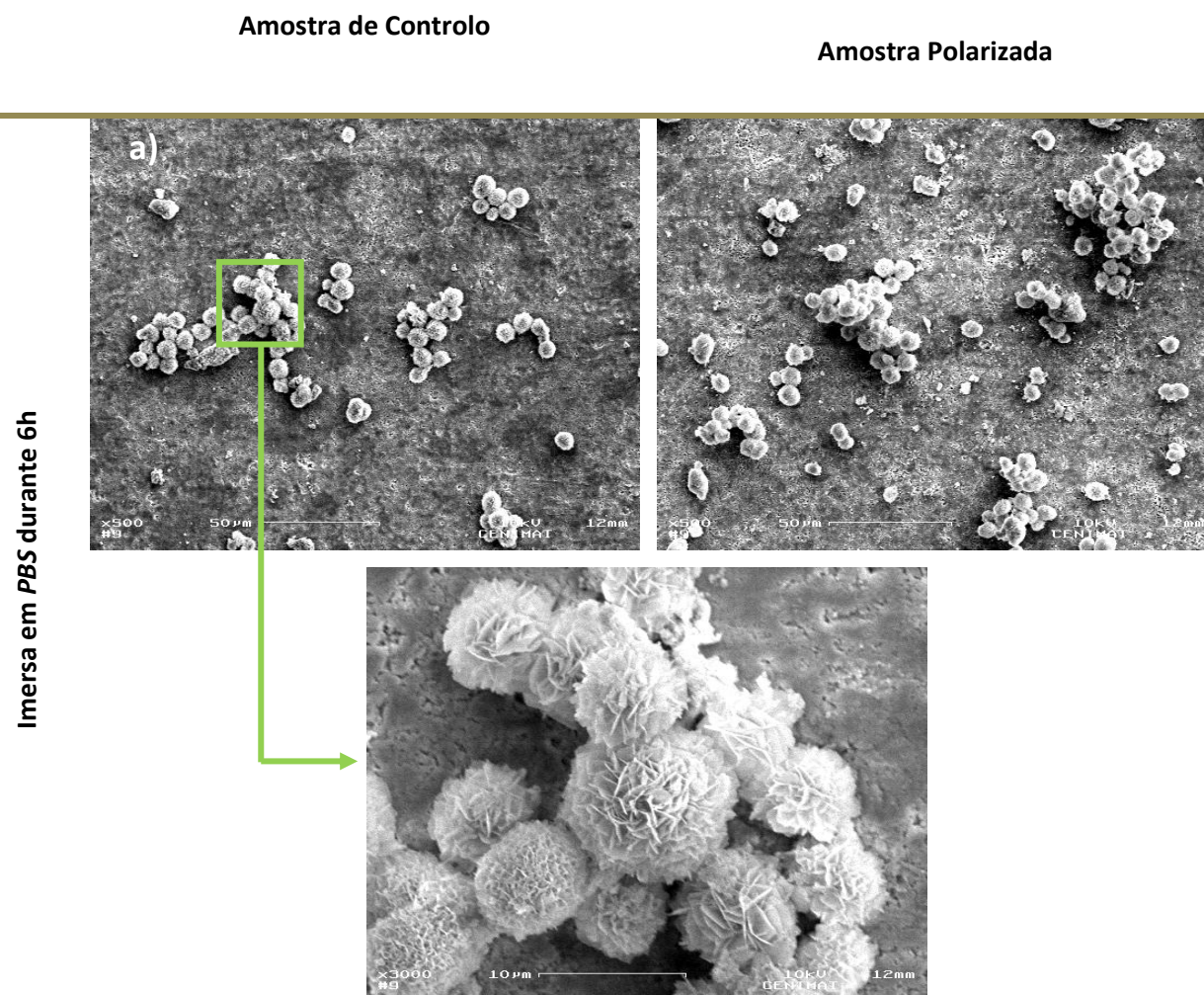


Figura IV.29: Espectros de DRS da componente real, σ' , e da componente imaginária, σ'' , da condutividade em função da frequência [Hz] e temperatura [K] obtidos, em vácuo, para uma amostra de HAp.

IV.3 Ensaios de Bioactividade

Decorrido o tempo estipulado para os ensaios de bioactividade, a superfície das amostras foi caracterizada por SEM. Recorreu-se também à técnica de ICP-AES para a análise elementar dos iões de cálcio e fósforo presentes nas soluções de PBS onde as amostras estiveram imersas, no respectivo período. A técnica de ICP-AES permitiu quantificar a precipitação de cristais apatíticos na amostra, uma vez que a precipitação de cristais de fosfato de cálcio (CaP) na superfície da amostra também se relaciona com a libertação de iões cálcio e fósforo da amostra de HAp para a solução e, portanto, com a concentração destes iões na solução de teste.

Na Figura IV.30, apresentam-se algumas das imagens de SEM captadas da superfície negativa das amostras de HAp polarizadas e das amostras de HAp de controlo, encontrando-se a evolução da concentração de cálcio e fósforo presente nas soluções teste (PBS) na Figura IV.31.



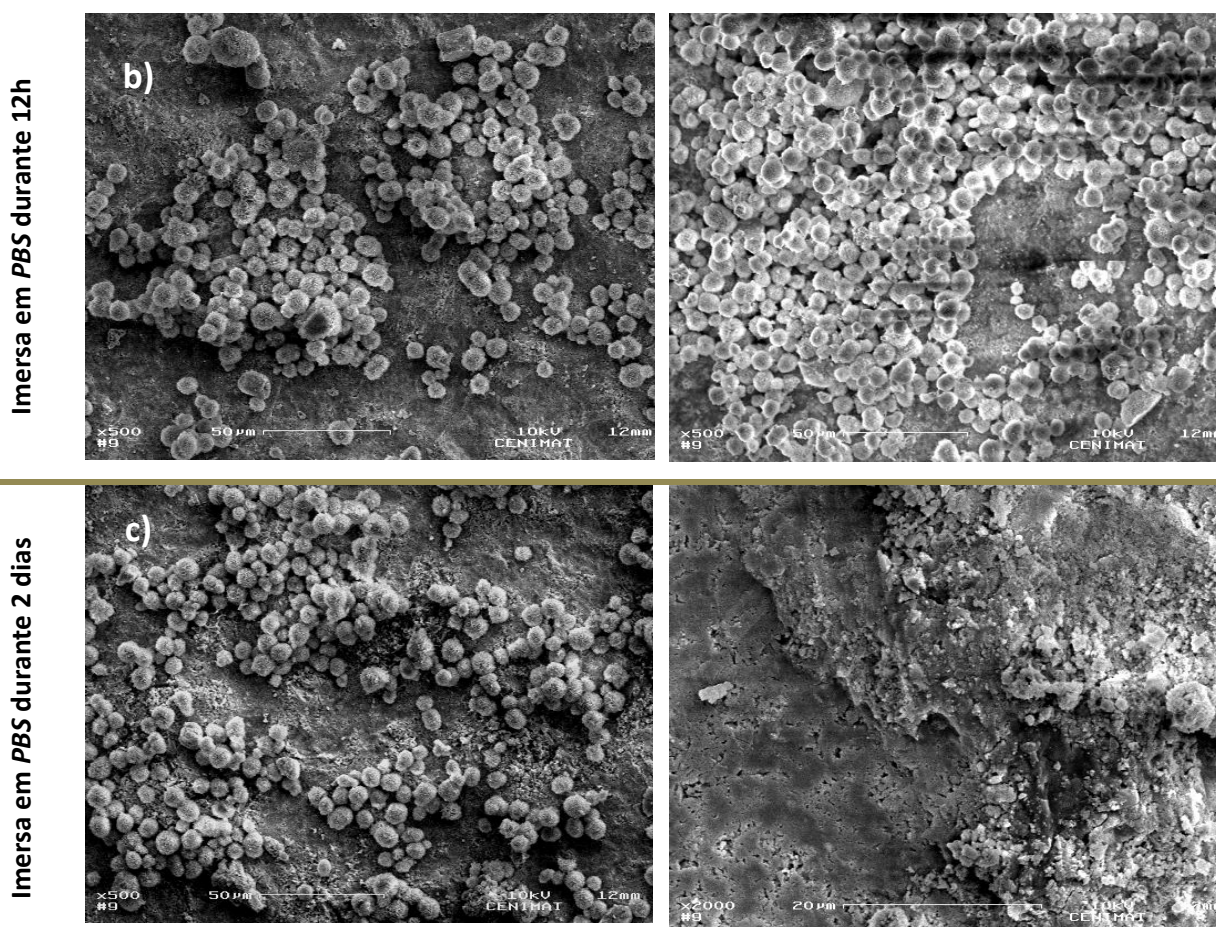


Figura IV.30:Imagens de SEM obtidas para as amostras de hidroxiapatite imersas em PBS durante 6h (a), 12h (b) e 2 dias (c).

Relativamente às imagens de SEM apresentadas na Figura IV.30 podemos aferir que, de facto, o processo de precipitação de cristais de fosfato de cálcio é acelerado na superfície da HAp carregada negativamente. Decorridas, apenas, 12h de imersão em *PBS*, as amostras polarizadas apresentam cristais de CaP em praticamente toda a sua superfície (o que não se verifica na amostra de controlo, amostra não polarizada, imersa em *PBS* durante o mesmo período). Após 2 dias de imersão em *PBS* já se identificam diferentes camadas de precipitados de CaP nas amostras de HAp polarizadas, enquanto nas amostras de controlo apenas se confirmam aglomerados de cristais em determinadas regiões. Por último, tanto após 7 dias como após 14 dias de imersão em *PBS*, as camadas de CaP que recobrem a superfície das amostras de HAp já se encontram de tal modo densas e homogêneas que as imagens de SEM das mesmas se assemelham à imagem de SEM da amostra antes de ser submetida ao teste de bioactividade (Figura IV.2).

Ainda por observação de SEM é de notar que os cristais de CaP que precipitam na superfície das amostras de HAp imersas em *PBS* se apresentam esféricos e em forma de flor (*flower-like structures*), como se corrobora pela imagem ampliada apresentada na Figura IV.30. Estes cristais, com o decorrer do tempo de imersão em *PBS*, tornam-se mais densos, formando aglomerados progressivamente mais compactos.

Inerente a todas as imagens de SEM captadas da superfície das amostras submetidas ao teste de bioactividade verifica-se o surgimento de fissuras resultantes da libertação de iões da amostra para a solução. A libertação de iões de cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) decorrente da dissolução da HAp, assim como a consequente precipitação dos mesmos na superfície das amostra foi analisada por ICP-AES (Figura IV.31). Mediante a análise de ICP-AES efectuada às soluções de *PBS* utilizadas nos ensaios de bioactividade não é possível retirar ilações em relação ao tipo de fosfato de cálcio que precipitou na superfície da hidroxiapatite, uma vez que a solução de *PBS* utilizada nos ensaios de bioactividade contém excesso de iões fosfato. Pelas curvas de concentração representadas na Figura IV.31 verifica-se que, no que respeita à concentração de cálcio, a sua variação, no decorrer dos 14 dias dos ensaios de bioactividade, se apresenta semelhante para as soluções onde as amostras polarizadas e de controlo estiveram imersas. Ao longo dos 7 primeiros dias de teste a concentração de cálcio presente na solução foi diminuindo, fazendo-se sentir um ligeiro aumento na mesma nos últimos 7 dias. A diminuição da concentração de iões Ca^{2+} nas soluções *PBS* poderá significar que a libertação de cálcio da amostra de HAp para a solução, referente à dissolução da HAp em *PBS*, é inferior à quantidade de cálcio que precipita na superfície da amostra, isto é, a velocidade com que ocorre a dissolução da HAp é inferior à velocidade à qual ocorre a precipitação de cristais de CaP na superfície das amostras. Por sua vez, analisando a concentração de fósforo em solução, verifica-se alguma discrepância entre as concentrações deste ião presente nas soluções onde estiveram imersas as amostras polarizadas e as amostras de controlo. Após um período de imersão de 3 dias em *PBS*, a solução onde se encontrava a amostra de HAp polarizada apresenta uma concentração de fósforo superior à determinada para a solução de *PBS* onde se encontrava a amostra de HAp não polarizada, aumentando significativamente esta diferença nos últimos 7 dias de teste. Analisando conjuntamente ambos os gráficos da Figura IV.31 é possível aferir que a precipitação de cristais apatíticos nas amostras de HAp, polarizadas e não polarizadas, ocorre, essencialmente, nos primeiros 3 dias. Ainda em relação à análise conjunta destes dois gráficos poder-se-á afirmar que os precipitados que se formam na superfície das amostras de HAp possuem uma razão molar Ca/P

inferior a 1.67 e que, conseqüentemente, possuem uma taxa de dissolução superior à apresentada pela HAp. Deste modo, o aumento na concentração de cálcio e fósforo que se percebe, essencialmente, nos últimos 7 dias dos testes de bioactividade deve-se, possivelmente, à dissolução do filme formado na superfície das amostras no decorrer dos ensaios e não à dissolução da amostra de HAp. Pela análise de SEM é possível observar que os filmes formados na superfície das amostras se organizam em camadas, percebendo-se alguma estratificação. Esta estratificação das camadas neo-formadas observada por SEM, assim como a análise de ICP dos últimos 7 dias dos ensaios de bioactividade, indiciam, novamente, que os filmes que se formam têm origem na dissolução do filme formado anteriormente.

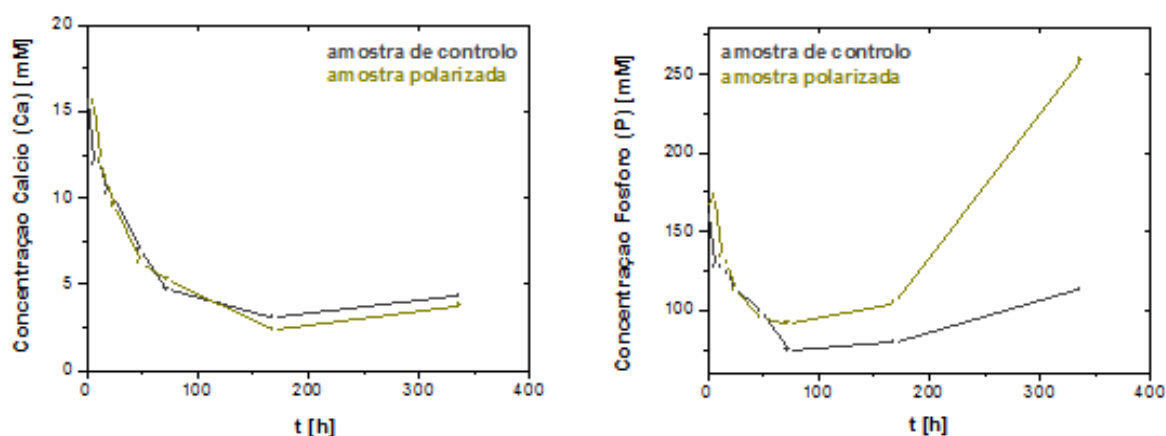


Figura IV.61: Diagrama representativo da concentração de cálcio e fósforo, em mM, presente nas soluções de PBS onde as amostras de HAp, de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.

Finalmente, analisando as imagens de SEM apresentadas na Figura IV.32 verificamos que a precipitação de cristais de fosfato de cálcio não ocorre de igual modo em ambas as superfícies da amostra polarizada, verificando-se esta precipitação apenas na superfície polarizada negativamente. Tal facto apresenta-se concordante com as publicações de Yamashita et. al [Yamashita, 1996], Kobayashi et. al [Kobayashi, 2007] e Gittings et. al [Gittings, 2008] que referem que o crescimento ósseo é acelerado nas superfícies de HAp carregadas negativamente e desacelerado nas superfícies carregadas positivamente, contrariando a tese de Kumar et. al [Kumar, 2010] que afirmam que a

precipitação de cristais de fosfato de cálcio em amostras de HAp polarizadas ocorre de igual modo independentemente da polaridade da superfície.

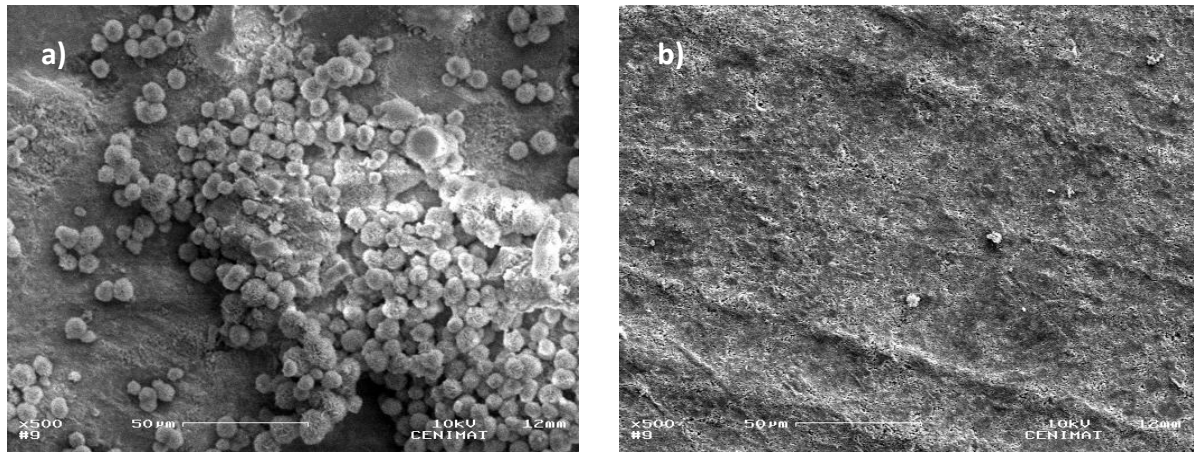


Figura IV.32: Imagens de SEM a) da superfície carregada negativamente e b) da superfície carregada positivamente da amostra de HAp imersa em *PBS* durante 3 dias.

CAPÍTULO V

Conclusões e Perspectivas Futuras

CAPÍTULO V – Conclusões e Perspectivas Futuras

A osteointegração é um processo envolto em bastante complexidade, sendo influenciado por diversos factores, entre os quais a polaridade da superfície do implante. O presente projecto foi desenvolvido com o intuito de estudar a bioactividade apresentada pela hidroxiapatite polarizada, comparando-a com a bioactividade apresentada pela hidroxiapatite não polarizada.

Tendo em atenção o objectivo final, iniciou-se o projecto com a produção de pós de HAp, recorrendo para tal ao método sol-gel. Pela caracterização efectuada a estes pós verificamos que, mediante a utilização deste método, sem controlo de pH, se obtêm grãos de HAp de tamanho nanométrico (de diâmetro médio inferior a 100nm), tendo sido detectada, por EDS, a presença dos constituintes básicos da HAp – oxigénio, fósforo e cálcio. A análise de DRX à amostra de HAp sinterizada a 600°C permitiu observar que estes mesmos grãos apresentam uma estrutura cristalina, verificando-se a não existência de contaminação da amostra, nomeadamente por CaO e β -TCP. Pela observação do espectro de FTIR da HAp produzida encontramos bandas características da formação de estruturas apatíticas centradas em números de onda na ordem de 1000cm^{-1} e 1100cm^{-1} . No que respeita ao estudo de FTIR, este permitiu ainda afirmar que a HAp produzida se encontra carbonatada, com substituição de carbonato do tipo B.

De um modo geral, pela caracterização eléctrica e dieléctrica da amostra constata-se que, uma vez exposta ao ar, a HAp facilmente incorpora água atmosférica.

Mediante os estudos de correntes isotérmicas efectuados verifica-se que aumentando a intensidade do campo eléctrico DC aplicado às amostras se obtêm densidades de corrente de carga, e de descarga, de maior magnitude. Verifica-se ainda que a temperatura à qual se aplica o campo eléctrico DC também influencia a densidade de corrente registada para a HAp verificando-se que quanto maior a temperatura de polarização da amostra maior a densidade de corrente de carga e mais rapidamente ocorre a descarga da amostra. Estudos comparativos efectuados, por correntes isotérmicas, entre pós micrométricos (pós comercializados pelo laboratório *Biotál*) e pós nanométricos (produzidos pelo método sol-gel), a 300.15K (27°C), permitiram verificar que, sob as mesmas condições de polarização, os nanocristais apresentam maiores densidades de corrente de carga. Verificou-se, também, que um período de carga de 9h, com um campo eléctrico DC de 1kV/cm de intensidade, a 300.15K (27°C), não é suficiente para que a amostra de HAp atinja a sua corrente de condutividade DC. Finalmente, ensaios de ICC/IDC efectuados à temperatura biológica (37°C)

revelaram que a HAp, quando sujeita à acção de um campo eléctrico DC de 1kV/cm de intensidade, durante 1h, gera densidades de corrente de carga entre 100-110nA.cm⁻².

Ainda no âmbito da caracterização eléctrica, recorrendo à técnica de TSDC verificou-se que a densidade de corrente de despolarização medida se encontra fortemente dependente da atmosfera em que se realizam os ensaios, assim como do tempo, t_0 , que decorre desde a remoção do campo eléctrico e a aquisição das correntes termoestimuladas. Como resultado dos estudos de TSDC verifica-se que a HAp apresenta um pico de corrente característico por volta dos 313.15K (40°C) que, possivelmente, se refere à substituição de carbonato que ocorreu na HAp produzida (visível no espectro de FTIR). À semelhança do aferido dos ensaios das correntes isotérmicas verifica-se que a temperatura de polarização, o tempo durante o qual se aplica o campo eléctrico DC e a intensidade do campo eléctrico DC utilizado para polarizar as amostras influenciam as correntes termoestimuladas. Deste modo, verifica-se que o aumento de cada um destes parâmetros se reflecte num aumento das densidades de corrente de descarga registadas. Neste sentido, as maiores densidades de corrente registaram-se para as amostras de HAp polarizadas, durante 1h, a 473.15K (200°C), sob a acção de um campo eléctrico DC de 20 kV/cm de intensidade. Para estas mesmas amostras obteve-se um valor de densidade de corrente máximo de 1.85×10^{-10} A.cm⁻² e uma carga de polarização, Q_p , de 6.19×10^{-5} C.cm⁻². Estimou-se ainda o tempo de relaxação, τ , da amostra polarizada sob estas condições, a 310.15K (37°C), concluindo-se que, uma vez implantada no corpo, a HAp se mantém polarizada durante um longo período de tempo ($\approx 7.05 \times 10^6$ seg). Por último, constata-se que a energia de activação, E_a , inerente aos processos de polarização que ocorrem na HAp é pouco dependente da intensidade do campo eléctrico DC de polarização, apresentando-se bastante dependente da temperatura, T_p , a que se polariza a amostra e do tempo, t_p , durante o qual a amostra é polarizada.

Pelos ensaios de DRS realizados verificamos que a HAp é, claramente, susceptível a um mecanismo de polarização. Os valores das componentes, real e imaginária, da permitividade da HAp diminuem com o aumento da frequência, aumentando para valores de temperatura mais elevados. No que se refere às componentes real e imaginária da condutividade da HAp, verifica-se que estas aumentam em intensidade com o aumento da temperatura e da frequência, apresentando valores máximos próximos de 1×10^{-3} S.m⁻¹ (σ') e de 2×10^{-5} S.m⁻¹ (σ'').

Finalmente, após a realização dos testes de bioactividade foi possível, por SEM, perceber as melhorias que a superfície negativa da HAp polarizada proporciona a nível da sua bioactividade.

Verificou-se que a deposição de cristais apatíticos ocorre a uma taxa mais acelerada na superfície da hidroxiapatite polarizada negativamente (uma vez que na superfície da hidroxiapatite polarizada positivamente, mesmo após 3 dias de imersão em PBS, não se observou precipitação de cristais de CaP). Ainda por SEM verificou-se que após, apenas, 12h de imersão em PBS, as amostras de HAp polarizadas apresentavam a sua superfície coberta, quase pela totalidade, por cristais de fosfato de cálcio (provavelmente de razão molar Ca/P inferior a 1.67), contrariamente ao sucedido com as amostras de HAp não polarizadas. Finalmente, a análise de ICP-AES permitiu confirmar que a libertação de iões fósforo das amostras de HAp polarizadas acontece a uma taxa mais acelerada.

O desenvolvimento deste projecto demonstrou que é possível melhorar a bioactividade de implantes de hidroxiapatite através da sua polarização. Tendo em atenção que esta constatação pode proporcionar uma melhoria na qualidade de vida dos cidadãos que recorrem a cirurgias de substituição/reparação óssea, seria importante a continuação desta investigação. Neste sentido, em estudos posteriores, seria interessante:

- ✓ Polarizar amostras de hidroxiapatite a temperaturas mais elevadas com o intuito de se alcançar uma maior carga de polarização e uma maior densidade de corrente;
- ✓ Tendo em atenção a aplicação da hidroxiapatite na área da medicina, realizar estudos de polarização em amostras deste biocerâmico com porosidade e interconexão suficiente para que material biológico (nomeadamente células) possa penetrar na cerâmica;
- ✓ Aumentar a carga de polarização residual das amostras de hidroxiapatite pela adição de um composto ferroeléctrico não tóxico ao organismo;
- ✓ Aplicar o método sol-gel utilizado para produzir sistemas de fosfato de cálcio com diferentes razões molares Ca/P (dada a facilidade de execução do método e as vantagens apresentadas, por exemplo, pelo β -TCP, no que respeita à sua taxa de degradação no organismo);
- ✓ Realizar ensaios de bioactividade em soluções com concentrações iónicas mais semelhantes ao plasma sanguíneo, de modo a reproduzir o melhor possível as condições *in vivo* (seria também interessante a incorporação de proteínas nestas mesmas soluções, dado o seu determinante papel na osteointegração).

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Amenlinckx, S. et. al (1997). Electron Microscopy: Principals and Fundamentals. VCH, capítulo2.
- Banys, J. et. al (2009). Dielectric Response of Water Confined in Metal-Organic Frameworks. Journal of Applied Physics, 96, 537-541.
- Bassett, C.; Pawluk, R.; Becker, R. (1964). Nature London, 204, 652.
- Bayraktar, D. T.; Cuneit, A. (1999). Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-Containing Synthetic Body Fluids. Journal of the European Ceramic Society, 19, 2573-2579.
- Becker, H. (1997). Organikum - Química Orgânica Experimental. 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Bodhak, S.; Bose, S.; Bandyopadhyay A. (2009). Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell-materials interactions of polarized hydroxyapatite. Acta Biomaterialia, 5, 2178–2188.
- Bogdanoviciene, I. et. al (2006). Calcium Hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Ceramics Prepared by Aqueous Sol-Gel Processing. Materials and Research Bulletin, 41, 1754-1762.
- Bohner, M.; Lemaître, J. (2009). Can Bioactivity Be Tested In Vitro with SBF Solution? Biomaterials, 30, 2175-2179.
- Bose, S. et. al (2010). Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties. Acta Biomaterialia, 6, 3782–3790.
- Bowen, C. R.; Gittings, J.; Turner, I. G. et. al (2006). Dielectric and Piezoelectric Properties of Hydroxyapatite-BaTiO₃ composites. Applied Physics Letters, 89, 132906.
- Bronzino, J. D.; Park, J. B. (2003). Biomaterials. Principles and Applications.
- Bucci, C.; Fieschi, R. (1964). Phys. Rev. Lett., 12, 16.
- Callister, W.; Rethwisch, D. (2011). Materials Science and Engineering. 8ª Edição, SI version, John Wiley & Sons, Asia.
- Cengiz, B. et. al (2008). Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 322, 29-33.
- Centexbel. <http://www.centexbel.be/solgel-treatment>, consultado a 23/09/2010.

- Christoffersen, J. et. al (1997). Effects of Strontium Ions on Growth and Dissolution of Hydroxyapatite and on Bone Mineral Detection. *Bone*, 20 (1), 47-54.
- Costescu, A. et. al (2010). Physico-Chemical Properties of Nano-sized Hexagonal Hydroxyapatite Powder Synthesized by Sol-Gel. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5 (4), 989-1000.
- Cullity, B.; Stock, S. (2001). *Elements of X-Ray Diffraction*. 3ª Edição, New Jersey - USA, Prentice Hall.
- Detsch, R.; Mayr, H.; Ziegler, G. (2008). Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia*, 4, 139–148.
- Dias, C. J. (2009). *Impedance Spectroscopy Module*.
- DUCHEYNE, P.; RADIN, S.; KING, L. (1993). *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 25.
- Fathi, M. H.; Hanifi, A.; Mortazavi, V. (2008). Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of materials processing technology.*, 202, 536-542.
- Fathi, M. H.; Hanifi, A. (2007). Evaluation and Characterization of Nanostructure Hydroxyapatite Powder Prepared by Simple Sol-Gel Method. *Materials Letters*, 61, 3978-3983.
- Fathi, M. H.; Zahrani, E. M. (2009). Mechanical Alloying Synthesis and Bioactivity Evaluation of Nanocrystalline Fluoridated Hydroxyapatite. *Journal of Crystal Growth*, 311, 1392-1403.
- Feki, H. et. al (2000). Studies by Thermally Stimulated Current (TSC) of Hydroxy and Fluoro-Carbonated Apatites Containing Sodium Ions. *J. Phys.: Condens. Matter*, 12(3000), 8331-8343.
- Feng, W.; Mu-sen, L.; Yu-peng, L.; Yong-xin, Q. (2005). A simple sol–gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters*, 59, 916-919.
- Ferraz, M.; Monteiro, F.; Manuel, C. (2004). Hydroxyapatite Nanoparticles: A Review of Preparation Methodologies. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanisms*, 2, 74-80.
- Franco, P. (2009). *Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação - Tese de Mestrado em Biotecnologia*. Lisboa: FCT/UNL.
- Fukada, E.; Iwao, Y. (1957). On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan*, 12(10), 1158-1162.
- Galassi, C. (2006). Processing Porous Ceramics: Piezoelectric Materials. *Journal of the European Ceramic Society*, 26, 2951-2958.

- Gittings, J. et. al (2007). Characterisation of Ferroelectric-Calcium Phosphate composites and Ceramics. *Journal of the European Ceramic Society*, 27, 4187-4190.
- Gittings, J. et. al (2009). Electrical Characterization of Hydroxyapatite-Based Bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 5, 743-754.
- Gun'ko, V. et. al (2007). TSDC spectroscopy of relaxational and interfacial phenomena. *Advances in Colloid and Interface Science*, 131, 1-89.
- Gutierrez, M. et. al (2006). Substituintes Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual, ed. M. A. Lopes. Porto: Arquivos de Medicina, 19 (4), 153-162.
- Hammond, C. (2001). *The Basics of Chrystallography and Difrraction*. 2ª Edição, Oxford: International Union of Crystallography, Oxford University.
- Hitmi, N.; Lacabane, C.; Young, R. (1988). *J. Phys. Chem. Solids*, 49, 541.
- Hoepfner, T.; Case, E. (2002). The porosity dependence of the dielectric constant for sintered hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, 60:643-50.
- Itoh, S. et. al (2006). Effect of Electrical Polarization of Hydroxyapatite Ceramics on New Bone Formation. *Calcif Tissue Int*, 78, 133-142.
- Iwasaki, T. et al (2008). Rate of Bone-Like Apatite Formation Accelerated on Polarized Porous Hydroxyapatite. *J. Am. Ceram. Soc.*, 91(12), 3943-3949.
- Jalota, S.; Bhaduri, S.; Tas, A. (2008). Using a Synthetic Body Fluid (SBF) Solution of 27mM HCO_3^{2-} to Make Bone Substitutes More Osteointegrative. *Materials Science and Engineering*, 28, 129-140.
- Juhasz, J. et. al (2008). Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. *J Mater Sci: Mater Med*, 19, 1823-1829.
- Kalogeras, I.; Vassilikou-Dova, A.; Katerinopoulou, A. (2002). Axially Dependent Dielectric Relaxation Response of Natural Hydroxyapatite Single Crystals. *Journal of Applied Physics*, 29(1), 406-414.
- Khalil, S.; Beheri, H.; Fattah, W. (2002). Structural and Electrical Properties of Zirconia/Hydroxyapatite Porous Composites. *Ceram. Int.*, 28, 451-458.
- Kheradmandfard, M.; Fathi, M. (2010). Preparation and characterization of Mg-doped fluorapatite nanopowders by sol-gel method. *Journal of Alloys and Compounds*, 504, 141-145.

- Kim, Il-Seok; Kumta, P. (2004). Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. *Materials Science and Engineering*, 111, 232-236.
- Kim, Hae-Won; Kim, Hyoun-Ee (2005). Nanofiber Generation of Hydroxyapatite and Fluor-Hydroxyapatite Bioceramics.
- Kobayashi, T.; Nakamura, S.; Yamashita, K. (2001). Enhanced osteobonding by negative surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Biomed Mater Res*, 57, 477-484.
- Kokubo, T.; Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27, 2907-2915.
- Kovaleva, E. et. al (2008). Carbonated Hydroxyapatite Nanopowders for Preparation of Bioresorbable Materials. *Mat.-Wiss. U. Werkstofftech*, 39(11), 822-829.
- Kremer, F.; Schonhals, A. (2002). *Broadband Dielectric Spectroscopy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-43407-0.
- Kumar, D. et al (2010). Polarization of Hydroxyapatite: Influence on Osteoblast Cell Proliferation. *Acta Biomaterialia*, 6, 1549-1554.
- Laghizil, A. et. al (2001). Electrical Behaviour of Hydroxyapatites $M_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (M=Ca, Pb, Ba). *Mater. Res. Bull.*, 36, 953-962.
- Li, L.; Yang, G. (2008). In situ Synthesis of Bone-Like Hydroxyapatite/polyamide 6 Nanocomposites. *Polymer International*, 57, 1226-1234.
- Lu, X.; Leng, Y. (2005). Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*, 26, 1097-1108.
- Luz, G. (2007). Revestimentos de Hidroxiapatite em Titânio pela Técnica Sol Gel. In *Da construção de um Dip Coater ao revestimento de Implantes Dentários*. Lisboa: G.A.M.L - FCT/UNL.
- Marques, P. A. (2003). Reações de Superfície de Cerâmicos de Fosfato de Cálcio em Plasma Simulado. Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Matsumoto, T. et. al (2007). Modification of Apatite Materials for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery Carriers. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 2726-2733.
- Merkx, M. A. et. al (1999). Incorporation of Three Types of Bone Block Implants in the Facial Skeleton. *Biomaterials*, 20(7), 639-645.
- Monte, T.; Pépe, N. (2003). Estudo de Revestimentos em Biomateriais por Projecção Térmica. *Ciência e Tecnologia dos Materiais*, 15 (3/4), 51-58.

- Morrison, R. (1996). Química Orgânica. Capítulo 17, 13ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Nagai, M.; Nishino, T. (1988). Surface conduction of porous hydroxyapatite ceramics at elevated-temperatures. *Solid State Ionics*;28–30:1456–1461.
- Nakamura, S.; Takeda, H.; Yamashita, K. (2001). Proton Transport Polarization and Depolarization of Hydroxyapatite Ceramics. *Journal of Applied Physics*, 89 (10), 5386-5392.
- Nakamura, M. et. al (2009). Polarized Hydroxyapatite Promotes Spread and Motility of Osteoblastic Cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 783-790.
- Neagu, E. R. (2010). Thermally Stimulated Discharge Current: A Method to Study the Molecular Movements in Dielectric Materials. Conference presented in CENIMAT/I3N.
- Neagu, E. R.; Marat-Mendes, J. N. (2004). Electric Charge Transport and Trapping in Dielectrics Deduced from Isothermal and Non-Isothermal Measurements. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 11(2), 249-254.
- Patel, N. et. al (2002). A Comparative Study on the in vivo Behavior of Hydroxyapatite and Silicon Substituted Hydroxyapatite Granules. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 13 (12), 1199-1206.
- Planeix, Jean-Marc et. al (2003). A molecular tectonics–crystal engineering approach for building organic–inorganic composites. Potential application to the growth control of hydroxyapatite crystals. *Journal of Materials Chemistry*, 13, 2521-2524.
- Rajabi-Zamani, A. (2008). Synthesis of Nanocrystalline Carbonated Hydroxyapatite Powder Via Nonalkoxide Sol-Gel Method. *Materials Science and Engineering C*, 28, 1326-1329.
- Requimte. <http://www.requimte.pt/index.php?section=151> [consultado a 3 Janeiro de 2011].
- Rho, J. Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. (1998). Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone. *Med. Eng. Phys.*, 20(2), 92-102.
- Saidi-Amroun, N.; Saidi, M.; Oubouchou, H.; Bendaoud, M. (2009). The Effect of Space charge on Isothermal and non-isothermal Currents in Polyethylene Naphthalate. *Physics Procedia*, 2, 1285–1290.
- Salehi, S.; Fathi, M. (2010). Fabrication and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite/Zirconia Composite Nanopowders with Various Yttria Contents. *Ceramics International*, 36, 1659-1667.

- Santos, M. L. et. al (2005). Síntese de Hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Ecl. Química* 3, volume 30, 29-35.
- Silva, C. et. al (2009). Structural and Electrical Study of Calcium Phosphate Obtained by a Microwave Radiation Assisted Procedure. *Physica B*, 404, 1503-1508.
- Ślósarczyk, A. et. al (2005). FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods. *Journal of Molecular Structure*, 744-747, 657-661.
- Smith, W. (1998). *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais*. Terceira edição, s.l. : Mc Graw Hill.
- Solomons, G.; Fryhle, C. (2000). *Química Orgânica*. 7ª Edição, LTC, capítulo2.
- Tanahashi, M.; Yao, T.; Kokubo, T.; et. al (1994). Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process. *J. Am. Ceram. Soc.* , 77, 2805.
- Tanaka, Y. et. al (2010). Polarization and Microstructural Effects of Ceramic Hydroxyapatite Electrets. *Journal of Applied Physics*, 107, 014107.
- Tas, A. (2000). Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21, 1429-1438.
- Tofail, S. et. al (2005). Structural Order and Dielectric Behaviour of Hydroxyapatite. *Ferroelectrics*, 319, 117-123.
- Ueshima, M.; Nakamura, S.; Yamashita, K. (2002). *Adv. Mater.*, 14, 591.
- Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J. (2004). Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 1-31.
- Wang, W. et. al (2009). Comparison of Enhancement of Bone Ingrowth into Hydroxyapatite Ceramics With Highly and Poorly Interconnected Pores by Electrical Polarization. *Acta Biomaterialia*, 5, 3132-3140.
- Wang, F., et. al (2005) A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters*, 59, 916-919.
- Weng, W.; Baptista, J. L. (1997). A New Synthesis of Hydroxyapatite. *Journal of the European Ceramic Society*, 17, 1151-1156.
- Weng, W.; Baptista, J. L. (1998). Sol-Gel Derived Porous Hydroxyapatite Coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9, 159-163.
- Wenisch, S. et. al (2003). In vivo Mechanisms of Hydroxyapatite Ceramic Degradation by Osteoclasts: Fine Structural Microscopy. *Wiley Periodicals*, 712-718.

- White, A.; Best, S. (2007). Hydroxyapatite-Carbon Nanotube Composites for Biomedical Application: A Review. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 4(1), 1-13.
- Wolff, J. (1986). *The Law of Bone Remodeling*. Springer Berlin.
- Yamashita, K. et. al (1995). Thermal-Instability and Proton Conductivity of Ceramic Hydroxyapatite at High Temperatures. *J. Am. Ceram. Soc.*, 78, 1191-1197.
- Yamashita, K.; Oikawa, N.; Umegaki, T. (1996). Acceleration and Deceleration of Bone-Like Crystal Growth on Ceramic Hydroxyapatite by Electric Poling. *American Chemical Society*, 8, 2697-2700.
- Zakharov, N.; Orlovskii, V. (2001). Dielectric Characteristics of Biocompatible $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Ceramics. *Technical Physics Letters*, 27(8), 629-631.
- Zhang, H. et. al (2010). Biocompatibility and Bioactivity of Hydroxyapatite Whiskers Reinforced bis GMA based Composites. *3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, 1640-1644.
- Zhang, L.; Webster, T. (2009). Nanotechnology and Nonomaterials: Promises for Improved Tissue Regeneration. *Nano Today*, 4, 66-80.